

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0042110
(43) 공개일자 2024년04월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/47 (2006.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61P 3/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/47 (2013.01)
A61K 47/60 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7008410(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2024년03월12일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7023039
원출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2020년12월29일
- (85) 번역문제출일자 2024년03월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2018/050018
- (87) 국제공개번호 WO 2018/127920
국제공개일자 2018년07월12일
- (30) 우선권주장
62/442,537 2017년01월05일 미국(US)
- (71) 출원인
프로탈릭스 리미티드
이스라엘 20100 카르미엘, 싸이언스 파크, 스누니
트 스트리트 2
- (72) 발명자
알몬, 에이넛
이스라엘 팀랏 3657600 하다스 스트리트 10
체르트코프, 라울
이스라엘 아디 1794000 야할롬 스트리트 1
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인다나

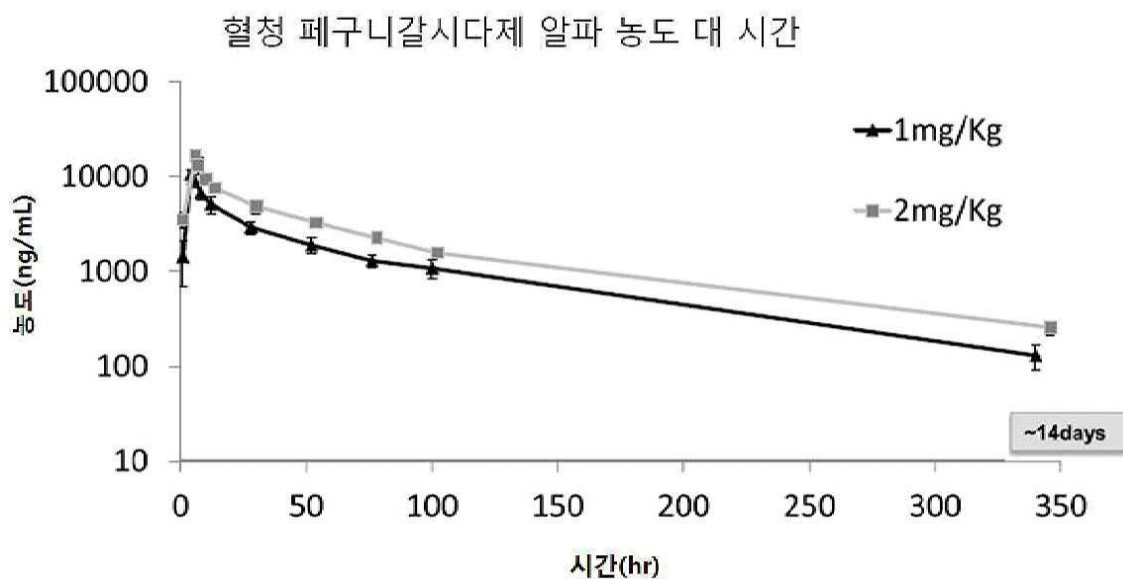
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 안정화된 알파-갈락토시다제를 이용하는 파브리외의 치료를 위한 치료적 요법

(57) 요약

연결 부분을 통해 서로 공유적으로 연결된 적어도 하나의 α -갈락토시다제 단량체를 포함하는 안정화된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제 단백질의 투여를 통한 파브리외의 치료 방법 및 단백질의 단위 투여량이 본 명세서에 개시되어 있다. 개시된 프로토콜은 안전하고, 투여 사이에 2주 이상 간격을 가지며, 감소된 Gb3 축적, 통증 및 GI 파라미터, 신장 및 임상 안정화에서의 심장 안정화와 관련하여 환자의 질환 파라미터의 중요한 개선을 나타낸다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 3/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

C12N 9/2465 (2013.01)

C12Y 302/01022 (2013.01)

(72) 발명자

알론, 사리

이스라엘 베이트 하케렘 도아르-나 비캇 2010700

키부츠 모란

샤알티엘, 요세프

이스라엘 팀랏 3657600 하알론 스트리트 44

명세서

청구범위

청구항 1

치료가 필요한 인간 개체에서 파브리병(Fabry disease)을 치료하기 위한 키트로서,

상기 키트는 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 재조합 인간 α -갈락토시다아제와 약학적 조성물의 투여 지침을 포함하는 약학적 조성물을 포함하고,

상기 투여 지침은 활성 성분의 2.0 mg/kg체중의 투여량으로 상기 약학적 조성물이 4주마다 1회 투여되어야 함을 나타내며,

상기 개체는 4주 간격으로 2.0 mg/kg체중의 지시된 용량으로 상기 약학 조성물을 투여한 후 하나 이상의 파브리 병 파라미터에서 유사한 악화 속도를 유지하는 개체이고,

상기 4주 간격으로 2.0 mg/kg체중으로 구성된 지시된 용량으로의 약학적 조성물의 투여는 투여 12개월 후에 상기 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 재조합 인간 α -갈락토시다아제에 대한 신규한 (de novo) 혈청 항체를 유도하지 않는, 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 식물 재조합 인간 α -갈락토시다아제인 것인, 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 투여는 정맥 투여인 것인, 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 투여는 상기 개체에서 Gb3 및/또는 라이소 Gb3를 감소시키는 것인, 키트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 2.0 mg/kg체중의 4주마다 1회 투여는 상기 개체에서 다음 중 하나 이상을 제공하는 것인, 키트:

- (i) 심장 파라미터인 LVM 또는 LVMI의 악화의 악화;
- (ii) 혈장 Gb3 농도의 감소, 라이소 Gb3 농도의 감소 및 소변 Gb3 농도의 감소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 파라미터의 안정성 유지;
- (iii) 신장 기능의 파브리병-관련 악화의 악화;
- (iv) 하나 이상의 위장 파라미터(gastrointestinal parameter)의 악화의 악화; 및
- (v) 마인츠 심각도 점수 지표(Mainz Severity Score Index, MSSI)의 악화의 악화.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 2.0 mg/kg체중의 4주마다 1회 투여는 상기 개체에서 신장 기능의 파브리 병-관련 악화를 악화시키는 것인, 키트.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 2.0 mg/kg체중의 4주마다 1회 투여는 상기 개체에서 하나 이상의 위장 파라미터의 악화를 악화시키는 것인, 키트.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 2.0 mg/kg체중의 4주마다 1회 투여는 상기 개체에서 MSSI의 악화를 약화시키는 것인, 키트.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 투여 후에 적어도 20시간의 순환 반감기($T_{1/2}$)를 갖는 것인, 키트.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 투여 후에 적어도 50시간의 순환 반감기($T_{1/2}$)를 갖는 것인, 키트.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제 1 mg/kg체중 투여 후에 적어도 5000 ng/ml의 C_{max} 를 갖는 것인, 키트.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 2 mg/kg 투여 후에 적어도 8000 ng/ml의 C_{max} 를 갖는 것인, 키트.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제의 1 mg/kg 투여 후 적어도 100,000 ng*hr/ml의 생체이용률(bioavailability)($AUC_{0-\infty}$)을 갖는 것인, 키트.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제는 상기 재조합 인간 α -갈락토시다아제의 2 mg/kg 투여 후 적어도 400,000 ng*hr/ml의 생체이용률($AUC_{0-\infty}$)을 갖는 것인, 키트.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 인간 개체에 투여하기 위해 제형화된 재조합 인간 α -갈락토시다아제 20 mg 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 단위 복용량(unit dosage)으로 제공되는 것인, 키트.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 α -갈락토시다아제 단백질은 서열번호 2 또는 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것인, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 일부 구현에는 α -갈락토시다아제의 동중이량체(homodimeric) 단백질 구조 및, 구체적으로, 그러나 제한되지는 않으며, α -갈락토시다아제의 안정화되고 공유 결합된 이합체 단백질 구조를 이용한 효소 대체 요법에 의한 파브리병(Fabry disease)의 치료를 위한 효과적인 치료 요법(regimen)에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 리소좀성 효소 α -락토시다아제 A(α -GAL 또는 α -Gal A; EC 3.2.1.22)는 거대분자의 대사과정 중에 올리고당,

당단백질 및 당지질로부터 갈락토스의 제거를 촉매한다. 리소좀성 효소의 결핍은 다양한 조직에서 상기 기질의 축적, 리소좀성 저장 질환으로 알려진 질병을 초래한다. 인간에서, α -갈락토시다아제 A의 부재는 조직에서 말단 α -갈락토스 잔기(주로, "세라마이드 트리헥소사이드(ceramide trihexoside)", "CTH" 또는 "Gb3"로 언급되는 글로보트리아오실세라마이드(globotriaosylceramide))를 포함하는 당지질의 축적을 초래하여, 파브리병으로 이어진다. 파브리병은 만성 통증, 안구 혼탁, 간 및 신장 손상, 피부 병변, 혈관 악화 및/또는 심장 결함을 특징으로 하는, 1898년에 최초로 기술된 X-연관 열성 장애이다. 재조합 인간 α -갈락토시다아제 A는 환자에서 감소된 효소 활성을 대체하고 제공하는 능력이 있으며, α -GAL을 사용한 효소 대체 요법 (enzyme replacement therapy, ERT)은 2003년에 미국과 유럽 국가에서 파브리병의 치료제로 승인되었다. α -GAL은 고체병(Gaucher disease)의 치료를 위한 α -글루코시다아제 이후 리소좀성 저장 질환의 치료를 위해 승인된 두번째 재조합 단백질이다.

- [0004] 내재성 및 재조합 α -GAL 효소는 피부, 신장, 심장 등과 같은 장기 세포의 리소좀에서 말단 갈락토실화 (terminal galactosylated glycolipids)된 당지질의 가수분해를 촉매한다. 이러한 자연적 행동 환경은 그것의 산성 pH에 의해 특징 지어지며, 4.5까지 낮아진다. 따라서 α -GAL을 포함한 리소좀성 효소는 이러한 낮은 pH 수준에서 최대 활성을 나타내기 위해 고안되었다.
- [0005] 현재 파브리 ERT 치료는 임상적 효능이 제한적이고 현재 파브리 환자에게 만족스러운 임상적 해결책을 제공하지 못하는 것으로 여겨지는 포유류-세포 유래 재조합 α -GAL을 기반으로 한다.
- [0006] X-선 구조 분석은 인간 α -GAL이 각 단량체가 활성 영역을 함유하는 (α/α)₈ 도메인과 α 샌드위치에서 두 시트에 8개의 역평행 α 가닥을 함유하는 C-말단 도메인의 두 개 도메인으로 이루어진 동종이량체성 당단백질을 나타낸다[Garman & Garboczi, J Mol Biol 2004, 337:319-335].
- [0007] 구조적(X-선 결정학) 및 생화학적(운동) 증거 모두는 효소 활성 및 α -GAL 치료 조성물의 안정성에 있어 이량체화의 중요성을 강조하는, 동종이량체성 구조의 단량체 단위 사이의 활성 부위 협동성(cooperativity)을 제시한다.
- [0008] 본 출원인에 의해, 본원에 전체로서 참고로 인용된 WO 2009/024977은 비소수성 링커를 통해 그 사이에 공유 결합된 당 및 생체분자의 접합체(conjugate)뿐만 아니라, 상기 접합체를 사용한 의학적 용도를 교시한다.
- [0009] 본 출원인에 의해, 본원에 전체로서 참고로 인용된 WO2011/061736는 리소좀성 pH보다 높은 pH 수준에서 리소좀성 활성을 나타내는 α -갈락토시다아제를 이용하는 방법을 교시하고 있다.
- [0010] 본 출원인에 의해, 본원에 전체로서 참고로 인용된 WO2011/107990은 생리학적 조건 및 상승된 약물력학 (pharmacodynamic)에서 왕성한(robust) α -갈락토시다아제 촉매 활성을 갖는 적어도 2개의 α -갈락토시다아제 단량체를 포함하는 공유 결합된 다량체성 단백질 구조 및 그의 치료 용도에 대한 제안을 교시하고 있다.
- [0011] 본 출원인에 의해, 본원에 전체로서 참고로 인용된 WO2012/098537은 촉매적으로 활성인 α -갈락토시다아제의 식물에서 재조합 발현을 위한 핵산 구조물 및 그의 치료 용도에 대한 제안을 교시하고 있다.
- [0012] 본원에 전체로서 참고로 인용된 Do 등의 미국 특허 공보 2016/0324839는 리소좀 표적화 펩티드와 리소좀성 효소의 가교(cross-linking) 방법을 교시한다.
- [0013] 본원에 전체로서 참고로 인용된 Stefano 등의 미국 특허 공보 2015/0320844는 수용체 결합 부위를 차폐하기 위해 중합체를 사용하는 리소좀 단백질의 표적화를 교시한다.
- [0014] 본원에 전체로서 참고로 인용된 Icahn School of Medicine의 미국 특허 공보 2014/120900은 α -갈락토시다아제 대체 요법의 투여 후 위장 파라미터의 개선을 교시한다.
- [0015] 본원에 전체로서 참고로 인용된 Whybra 등(Ch. 32 in "Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS", Oxford Pharmagenesis, 2006, pages 1-10)은 α -갈락토시다아제 대체 요법의 투여 후 MSS의 개선을 교시한다.
- [0016] 추가적인 배경 기술은 Bendele et al. [Toxicological Sciences 1998, 42: 152-157], 미국 특허 번호 제 5,256,804호, 제5,580,757호 및 제5,766,897호, 국제 특허 출원 PCT/NL2007/050684 (WO2008/075957로 공개됨), Treco 등의 미국 특허 공보 US20160184409 및 Seely&Rhehey [J Chromatography A 2001, 908: 235- 241]를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 치료적 유효량의 재조합 인간 α -갈락토시다제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 치료가 필요한 인간 개체에서 파브리 병을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 치료적 유효량의 재조합 인간 α -갈락토시다제는 0.2 내지 2.0 mg/kg이고, 이에 따라 개체에서 파브리병을 치료하며, 상기 투여는 2주 이상의 간격으로 수행되고, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 단량체는 길이 20 내지 600 원자의 결합 모이어티를 통해 서로 공유 결합된다.

과제의 해결 수단

- [0018] 발명의 요약
- [0019] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 치료적 유효량의 재조합 인간 α -갈락토시다제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 치료가 필요한 인간 개체에서 파브리 병을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 치료적 유효량의 재조합 인간 α -갈락토시다제는 0.2 내지 2.0 mg/kg이고, 이에 따라 개체에서 파브리병을 치료하며, 상기 투여는 2주 이상의 간격으로 수행되고, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 단량체는 길이 20 내지 600 원자의 결합 모이어티를 통해 서로 공유 결합된다.
- [0020] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 치료적 유효량의 재조합 인간 α -갈락토시다제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 치료가 필요한 인간 개체에서 파브리 병을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 치료적 유효량의 재조합 인간 α -갈락토시다제는 0.2 내지 2.0 mg/kg이고, 이에 따라 개체에서 파브리 병을 치료하며, 상기 투여는 2주 초과 내지 매 4주 간격으로 수행되고, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 단량체는 길이 20 내지 600 원자의 결합 모이어티를 통해 서로 공유 결합된다.
- [0021] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제이다.
- [0022] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제는 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된다(cross-linked).
- [0023] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격(interval)은 3주 또는 4주이다.
- [0024] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 17일 내지 8주이다.
- [0025] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 17일 내지 6주이다.
- [0026] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 17일 내지 5주이다.
- [0027] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 3주 내지 6주이다.
- [0028] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 3주 내지 5주이다.
- [0029] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 3주 내지 4주이다.
- [0030] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 4주 내지 6주이다.
- [0031] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 간격은 4주 내지 5주이다.
- [0032] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여(administering)는 정맥(intravenous) 투여이다.
- [0033] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여는 1.0 mg/kg 용량으로 수행된다.
- [0034] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여는 2.0 mg/kg 용량으로 수행된다.
- [0035] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여는 3주마다 한 번씩 수행된다.
- [0036] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여는 4주마다 한 번씩 수행된다.
- [0037] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여는 5주마다 한 번씩 수행된다.
- [0038] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 투여는 6주마다 한 번씩 수행된다.
- [0039] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서

Gb3 및/또는 리소(lyso) Gb3를 감소시킨다.

- [0040] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 심장 파라미터의 안정성을 유지시키거나 또는 악화(deterioration)를 약화시킨다.
- [0041] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 심장 파라미터는 전처리 값과 비교하여 MRI로 측정된 LVM 또는 LVMI이다.
- [0042] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 혈장 Gb3 및/또는 리소-Gb3 농도 감소의 안정성을 유지시킨다.
- [0043] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 소변 Gb3 농도 감소의 안정성을 유지시킨다.
- [0044] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 파브리병-관련 신장 기능의 악화를 약화시킨다.
- [0045] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 신장 기능의 안정성을 유지시킨다.
- [0046] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 적어도 하나의 위장 파라미터의 안정성을 유지시키거나 악화를 약화시킨다.
- [0047] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 위장 파라미터는 전처리 값과 비교하여 치료 6개월 후 측정된 복통 및/또는 복통의 빈도이다.
- [0048] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 개체에서 마인즈 심각도 점수 지표(Mainz Severity Score Index, MSSI)의 안정성을 유지시키거나 악화를 약화시킨다.
- [0049] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 MSSI의 감소는 전처리 값과 비교하여 치료 6개월 후 측정된다.
- [0050] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 투여 후 적어도 5시간의 순환 반감기(circulating half-life, $T_{1/2}$)를 갖는다.
- [0051] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 투여 후 적어도 20시간의 순환 반감기($T_{1/2}$)를 갖는다.
- [0052] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 투여 후 적어도 50시간의 순환 반감기($T_{1/2}$)를 갖는다.
- [0053] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 재조합 인간 α -갈락토시다제의 1 mg/kg 투여 후 적어도 5000 ng/ml의 C_{max} 를 갖는다.
- [0054] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 재조합 인간 α -갈락토시다제의 2 mg/kg 투여 후 적어도 8000 ng/ml의 C_{max} 를 갖는다.
- [0055] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 재조합 인간 α -갈락토시다제의 1 mg/kg 투여 후 적어도 100,000 ng*hr/ml의 생체이용률(bioavailability)($AUC_{0-\infty}$)을 갖는다.
- [0056] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 재조합 인간 α -갈락토시다제의 2 mg/kg 투여 후 적어도 400,000 ng*hr/ml의 생체이용률($AUC_{0-\infty}$)을 갖는다.
- [0057] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 인간 개체에 투여하기 위해 제형화된 재조합 인간 α -갈락토시다제 2.0 내지 500 mg을 포함하는 단위 투여형(unit dosage form)이 제공된다.
- [0058] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 단위 투여형은 재조합 인간 α -갈락토시다제 10 mg을 포함한다.
- [0059] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 단위 투여형은 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제 50 mg을 포

함한다.

- [0060] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 단위 투여형은 재조합 인간 α -갈락토시다제 100 내지 180 mg을 포함한다.
- [0061] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 단위 투여형은 재조합 인간 α -갈락토시다제 150 mg을 포함한다.
- [0062] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 단위 투여형은 액체로 제형화된다.
- [0063] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 단위 투여형은 정맥 투여를 위해 제형화된다.
- [0064] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제의 단량체는 폴리(알킬렌) 글리콜(poly(alkylene) glycol) 연결 모이어티를 통하여 다른 하나와 공유 결합된다.
- [0065] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 폴리(알킬렌) 글리콜은 적어도 20개 알킬렌 기를 포함한다.
- [0066] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제이다.
- [0067] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 재조합 인간 α -갈락토시다제는 서열번호 1 내지 3에서 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 인간 α -갈락토시다제 단백질을 포함한다.
- [0068] 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 상기 인간 α -갈락토시다제는 단백질은 서열번호 2 또는 3이다.
- [0069] 별도로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및/또는 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사한 또는 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 구현예를 실시 또는 테스트하는데 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및/또는 재료는 하기에 기술된다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함하는 특허 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시에는 단지 예시적인 것이며 반드시 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0070] 연결 부분을 통해 서로 공유적으로 연결된 적어도 하나의 α -갈락토시다제 단량체를 포함하는 안정화된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제 단백질의 투여를 통한 파브리병의 치료 방법 및 단백질의 단위 투여량이 본 명세서에 개시되어 있다. 개시된 프로토콜은 안전하고, 투여 사이에 2주 이상 간격을 가지며, 감소된 Gb3 축적, 통증 및 GI 파라미터, 신장 및 임상 안정화에서의 심장 안정화와 관련하여 환자의 질환 파라미터의 중요한 개선을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 본 발명의 일부 구현예는 첨부 도면을 참조하여 예시로서만 설명된다. 이제 도면을 상세하게 참조하면, 도시된 세부 사항은 예시적인 것이며 본 발명의 구현예에 대한 설명을 목적으로 한 것임을 강조한다. 이와 관련하여, 도면과 함께 기재된 설명은 본 발명의 구현예가 실시될 수 있는 방법을 당업자에게 명백하게 한다.

도 1은 치료의 시작(1일)부터 14일까지 환자의 혈청에서 측정하고, 밀리리터(mL) 혈장 당 나노그램(ng) 페구니갈시다아제 알파(pegunigalsidase alfa)로 표시된, bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 식물 재조합 인간 α -GAL (페구니갈시다아제 알파)의 약동학(pharmacokinetic) 프로파일을 보여주는 그래프이다. 효소 농도는 0시간(투여 전/주입), 1시간(투여 개시 후 1시간), 투여(주입)의 종료시(EOI), 및 EOI 후 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96시간, 및 페구니갈시다아제 알파의 다음 투여 전에 투여 후 2주(14일)("C2wk") 시점에 채혈한 혈액 샘플에서 측정하였다. 그래프는 14일 기간 동안의 상이한 샘플링 시간에서 모든 집단(cohort)에 대한 평균 혈장 값(ng/mL)을 로그 스케일로 나타낸다. 삼각형(밝은 회색 선)은 1.0 mg/kg , 사각형(검은색 선)은 2.0 mg/kg 의 페구니갈시다아제 알파의 용량을 나타낸다.

도 2는 투여(주입) 개시 후 약 10시간 (600분)에 동안, 로그 스케일로 상업적으로 이용가능한 알가시다제 베타(algasidase beta) (r-알파hGalA, 포유류 세포 재조합 인간 α -GAL A, FabrazymeTM, Genzyme Corp, Cambridge MA)의 약동학 프로파일을 보여주는 공개적으로 이용가능한 PK 데이터로부터의 그래프이다. 이 자료는 American Genetics of Human Genetic, 68, 711-722, 2001에 있다. 비슷한 용량에 대한 페구니갈시다아제 알파의 생체이

용률(일 단위로 측정 가능)(도 1 참조)과 비교하여, 알가시다제 베타의 모든 농도의 단기(약 10시간) 생체이용률을 주목해야 한다.

도 3A 내지 3C는 아갈시다제(Agalsidase) 베타(r-알파hGalA, FabrazymeTM) 및 아갈시다제 알파(레프리갈TM, Shire Human Genetic Therapies (HGT), Inc., Cambridge, MA)의 이용가능한 공개 데이터와 비교한, 최대 혈장 농도(C_{max} , ng/mL)(도 3A), 반감기($T_{1/2}$, 시간)(도 3B) 및 계산된 총 이용가능한 효소 (곡선하 면적(area under the curve), $AUC_{0-\infty}$ $\mu g \cdot \text{분} / mL$)(도 3C)로 표시되는 페구니갈시다아제 알파의 약동학 파라미터를 설명하는 히스토그램이다.

제시된 페구니갈시다아제 알파의 용량(dosage)은 1.0 및 2.0 mg/kg이고, 아갈시다제 베타의 용량은 1.0 mg/kg 및 아갈시다제 알파의 용량은 0.2 mg/kg이다. 모든 파라미터(C_{max} ; $T_{1/2}$ 및 $AUC_{0-\infty}$)에서, 아갈시다제 알파 또는 베타와 비교하여 페구니갈시다아제 알파의 높은 약동학에 주목해야 한다.

도 4A 및 4B는 페구니갈시다아제 알파의 확장된 요법(매 2주마다 2 mg/kg 1회)의 가용성 모델링 (availability modeling)과 아갈시다제 베타의 표준 요법 (파브라자임)(매 2주마다 1 mg/kg 1회)의 모델링을 비교하는, 페구니갈시다아제 알파의 단일 주입으로부터 유도된 4주 기간 동안 효소 가용성 모델링의 그래픽 표현이다.

도 4A는 단일 주입 후 4주 기간 동안 추정(extrapolated) 효소 가용성을 나타내는 개략도이다:

도 4B는 4주 간격 이내에 1회 투여한 2 mg/kg 페구니갈시다아제 알파와 동일한 4주 간격 동안 2회 투여한 1 mg/kg 아갈시다제 베타(파브라자임)의 약동학적 파라미터의 비교 모델링이다:

도 4B는 2주마다 1회 투여한 1 mg/kg 아갈시다제 베타(파브라자임)의 부분 AUC와 4주마다 1회 투여한 2 mg/kg 페구니갈시다아제 알파에 대하여 4주 효소 가용성(매주당 계산된 부분 AUC)의 비교를 나타낸다.

투여 후 전체 4주 동안 페구니갈시다아제 알파의 단일 투여 후 예상되는(projected) 유의미한 효소 가용성과 비교하여 투여 후 일주일 동안 아갈시다제 베타 효소의 부분 AUC의 사실상 부존재에 유의해야 한다(아갈시다제 베타 베타 2주 및 4주 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0072] 본 발명은, 이의 일부 구현예에서, 안정화되고 공유적으로 결합된 인간 알파 갈락토시다제 동종이합체 효소에 관한 것이며, 보다 구체적으로는, 그러나 배타적이지는 않고, 안정화되고, 공유적으로 결합된 식물 재조합 인간 알파 갈락토시다제 효소에 관한 것이고, 효소 대체 요법에 의한 인간 파브리병의 치료에 있어서의 이의 효과적인 용도에 관한 것이다.
- [0073] 본 발명의 적어도 하나의 구현예를 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 그 적용에 있어서 이하의 설명 또는 실시예에서 예시된 세부 사항으로 반드시 제한되는 것은 아니라는 점을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 구현예가 가능하거나 또는 다양한 방법으로 실시되거나 수행될 수 있다. 리소좀성 단백질의 결핍(예를 들어, 리소좀성 단백질의 결핍 또는 리소좀성 단백질의 부존재)은 개체의 건강에 심각한 유해를 유발할 수 있다(리소좀성 저장 질환).
- [0074] 결핍 단백질을 환자에게 투여하는 효소 대체 요법(ERT)은 리소좀성 저장 질환 치료의 시도에 사용되어 왔다. 그러나 결핍 단백질의 투여가 생체 내에서 투여된 단백질의 상당한 및/또는 지속적인 활성을 반드시 초래하는 것은 아니다.
- [0075] 파브리병은 다양한 범위의 증상을 유발할 수 있는 X-연관 열성(유전성) 리소좀성 저장 질환의 한 예시이다. 돌연변이로 인한 리소좀성 효소 α -갈락토시다제 A의 결핍은 글로보트리아오실세라마이드(Gb3 또는 세라마이드 트리헥소시드로도 알려짐)로 알려진 당지질이 혈관, 다른 조직 및 기관 내에 축적되도록 한다. 이러한 누적은 적절한 기능의 손상을 초래한다. α -갈락토시다제 결핍을 기능적으로 보완하기 위해 두 가지 효소 대체 요법(ERT)이 이용가능하다. 아갈시다제 알파(레프리갈[®], 샤이어) 및 아갈시다제 베타 (파브라자임[®], 젠자임-사노피)는 모두 인간 α -갈락토시다제 A 효소의 재조합 형태이다. 아갈시다제 알파 및 아갈시다제 베타는 반감기가 짧아 생체 이용률이 제한되므로 임상 결과가 만족스럽지 않다.
- [0076] α -갈락토시다제의 손상된 활동을 해결할 필요성에 자극을 받아, 리소좀성 조건과 혈청 환경 모두에서 향상된 활성 및/또는 더 오래 지속되는 활성을 나타내는 안정화된 형태의 α -갈락토시다제(α -GAL)가 개발되었으며, 이

는 임상적으로 관련된 조건에서 생체 내에서 단백질의 잠재적인 오래 지속되는 향상된 활성을 의미한다. 또한, 공유적으로 결합된 본 발명의 인간 α -갈락토시다제는 파브리 환자로부터의 혈청에서 향상된 활성 및/또는 더 오래 지속되는 활성을 나타냈다.

[0077] 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제를 사용하여, 본 발명자들은 사람에서 파브리병의 효소 대체 요법에 대한 효과적인 신규 치료 용량 및 요법을 개발하였다. 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 임상 경험은 신규한 치료 요법에 따른, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제를 갖는 ERT가 인간에서 파브리병의 치료에 안전하고 효과적이라는 것을 보여 주었다. 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 현저히 향상된 약동학, 투여 후 10일 이상 동안 혈장 농도 유지, 1.0 mg/kg 투여량 (7,900 내지 23,000 ng/mL)에서 5,000 ng/mL 이상 및 2.0 mg/kg 투여량 (13,900 내지 46,500 ng/mL)에서 8,000 ng/mL 이상의 C_{max} 및 현재 이용가능한 ERT와 비교하여 향상된 생체이용률(AUC)을 보여 주었다.

[0078] 신장 세뇨관 주위 모세혈관(renal peritubular capillary) 세라미다제 트리헥소사이드 함유물(ceramidase trihexoside inclusions)을 감소시키는 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제로의 치료는 신장 기능의 특징적 약화를 약화시키고, 신장 기능 및 위장 증상을 개선하며, 환자의 통증 지표 점수를 감소시키고, 환자의 심장 기능을 개선 또는 안정화시키며, 물리적 활동 및 삶의 전반적 질을 개선한다. 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 향상된 약동학 및 생체 이용률로 인해 보다 넓은 주입 간격을 사용하는 효과적인 2 mg/kg 용량 요법(dosage regimen)으로 임상 연구에서 관찰된 것과 같은 임상적 개선은 가벼운 환자 내지 온건한 환자, 젊은 환자, 조기 진단받은 환자 및/또는 지속적인 환자를 포함하되 이에 국한되지 않는 특정 파브리 집단에 ERT 커버리지(coverage)를 제공할 수 있으므로 환자의 증상을 관리하고, 환자의 삶의 질을 현저히 개선시키며, 질병 합병증의 위험을 지연시켜 치료 및 환자 순응(compliance)의 큰 편의성이 제공된다.

[0079] 따라서, 본 발명의 일부 구현예의 한 측면에 따르면, 파브리병의 치료가 필요한 인간 개체에서 파브리병을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 치료적 유효량의 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제를 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 상기 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제의 상기 치료적 유효량은 0.2 내지 2.0 mg/kg이고, 이에 따라 개체에서 파브리병을 치료하며, 상기 투여는 2주 내지 매 4주 초과의 간격으로 수행되고, 상기 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제의 단량체는 폴리(알킬렌) 글리콜 결합 모이어티를 통해 서로 공유 결합된다.

[0080] 일부 구현예에 따르면, 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제는 공유 결합된 동종이량체 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제이다.

[0081] 일부 구현예에 따르면, 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제 단백질은 하기에 상세히 기술되는 바와 같이 천연 α -갈락토시다제의 안정성보다 높은 안정성 및/또는 천연 α -갈락토시다제의 초기 활성보다 높은 초기 활성을 특징으로 한다. 일부 구체예에서, 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질은 bis-NHS-PEG45로 가교된(cross-linked) 식물 재조합 인간 α -GAL이다.

[0082] 일부 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 상업적으로 이용가능한 아갈시다제 알파(레프라갈(Replagal)[®], 샤이어(Shire)) 및 아갈시다제 베타(파브라자임(Fabrazyme)[®], 젠자임(Genzyme))과 같은 비-식물(예를 들어, 포유류) 세포로부터 유래한 재조합 인간 α -갈락토시다제 단백질, 비-포유류 세포(식물, 세균, 곤충, 진균 등)에서 생산된 재조합 α -갈락토시다제 또는 임의 다른 기원의 적합한 α -갈락토시다제를 포함하는 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질을 사용하여 수행될 수 있다.

[0083] 본 명세서에 사용된 "파브리병"은 임의의 α -갈락토시다제 A 결핍을 나타낸다. "알파 갈락토스 A 결핍"은 개체에서 α -갈락토시다제 A의 천연 활성의 임의의 결핍을 나타내며, 주로 모세혈관 내피 세포, 신장 세포 및/또는 심장 근육 세포에서 당지질(예를 들어, 글로보트리아오실세라마이드)의 비정상적 축적을 초래한다. 이 물질의 침착은 심각한 신경장해성 통증 (예를 들어, 말단감각이상(acroparesthesia) 및 열상 통증(lacerative pain)), 심각한 신장 및 심혈관 질환 및/또는 뇌졸중을 초래할 수 있다. 당지질 축적은 파브리병으로 고통받는 개인에서 전형적으로 관찰되는 것과 같은 심각한 증상을 유발할 수 있다. 일반적으로, 더 심한 증상은 남성 환자에서 관찰되지만, 결핍 유전자의 이형접합 여성 캐리어(carrier)에서도 볼 수 있다. 이 질병은 특히 여성 환자에서 과소 진단되는 것으로 알려져 있다. 발병한 개인은 평균 수명이 크게 단축된다; 사망은 대개 삶의 네번째 내 다섯번째 시점에서 신장, 심장 및/또는 뇌혈관 합병증(cerebrovascular complication)으로 발생한다.

[0084] 본원에서, α -갈락토시다제에 대한 용어 "단량체(monomer)"는 α -갈락토시다제의 개별 폴리펩티드 "서브유닛(subunit)"을 지칭한다. 상기 폴리펩티드는 비-펩티드성 치환체 (예를 들어, 하나 이상의 당류 모이어티)를 포

함할 수 있다.

- [0085] 본원에서, α -갈락토시다제에 대한 용어 "천연(native)"은 자연 발생 α -갈락토시다제 단백질의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 (즉, 적어도 95% 상동성(homology), 선택적으로 적어도 95% 동일성(identity), 선택적으로 적어도 99% 상동성, 선택적으로 적어도 9% 동일성 및 선택적으로 100% 동일성) 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 갖는 포함한다. 천연 α -갈락토시다제는 천연 공급원으로부터 분리된 단백질 또는 재조합적으로 생산된 단백질 (예를 들어, 인간 세포, 포유동물 세포, 식물 세포, 효모 세포, 세균 세포, 곤충 세포 및 기타 등등으로부터 유래)일 수 있다.
- [0086] 용어 "천연"은 α -갈락토시다제의 4차 구조(예를 들어, α -갈락토시다제 이량체)와 관련하여 사용되는 경우 자연 발생 단백질의 4차 구조와 실질적으로 동일한 4차 구조를 추가로 포함한다.
- [0087] 본원에서, 문구 "자연 발생 단백질(naturally occurring protein)"은 단백질의 아미노산 서열뿐만 아니라 단백질이 안정화되고, 동종이량체성 형태인 경우 단백질의 4차 구조와 관련하여 자연(예를 들어, 유기체에서)에서 발생하는 형태인 단백질을 지칭한다.
- [0088] 자연 발생 α -갈락토시다제 단백질의 번역-후 변형(예를 들어, 당화 (glycosylation)) (예를 들어, 자연 발생 α -갈락토시다제 단백질을 발현하는 유기체에서)은 본 명세서에 언급된 α -갈락토시다제의 천연 형태에 존재하거나, 부재하거나 또는 변형될 수 있다. α -갈락토시다제의 천연 형태(예를 들어, 재조합적으로 생산된 α -갈락토시다제)는 상기 기술한 바와 같이, α -갈락토시다제의 천연 형태가 자연 발생 α -갈락토시다제와 실질적으로 동일한 아미노산 서열 및 구조를 유지한다는 가정 하에 천연 발생 α -갈락토시다제와 상이한 번역 후 변형을 선택적으로 포함할 수 있다.
- [0089] 본원에서, 단백질의 천연 형태는 단량체성 구조(예를 들어, α -갈락토시다제 단량체) 및/또는 다량체성 구조(예컨대, α -갈락토시다제 이량체)를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 이량체성 단백질은 천연 형태의 α -갈락토시다제로 기술될 수 있고, 이량체성 단백질 내의 단량체성 폴리펩티드는 천연 형태의 α -갈락토시다제 단량체로 기술될 수 있다.
- [0090] 선택적으로, 본원에 기술된 다량체성 단백질 구조는 α -갈락토시다제의 천연 형태와 같이 이량체성 구조이다. 대안으로, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 2개 이상의 α -갈락토시다제 단량체를 포함한다. 예를 들어, 다량체성 단백질 구조는 α -갈락토시다제 단량체를 포함하는 사량체, 육량체, 또는 팔량체일 수 있다.
- [0091] 본원에 기술된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 는 그안의 α -갈락토시다제 단량체를 연결하고, α -갈락토시다제의 천연 형태에는 존재하지 않는 공유 결합을 포함한다.
- [0093] 따라서, 예를 들어, 연결 모이어티는 선택적으로 결사슬, N-말단 또는 C-말단에 공유적으로 부착하는 모이어티이고, 또는 α -갈락토시다제의 단량체뿐만 아니라 결사슬, N-말단 또는 C-말단의 번역 후 변형과 관련된 모이어티(예를 들어, 당류 모이어티)이며, 또는 다른 α -갈락토시다제의 단량체의 번역 후 변형과 관련된 모이어티(예를 들어, 당류 모이어티)이다. 예시적인 이러한 연결 모이어티는 하기에 상세히 기술된다.
- [0094] 선택적으로, 상기 연결 모이어티는 이황화 결합(disulfide bond)이 없다. 그러나 단량체 사이의 연결을 형성하지 않는 위치에서 이황화 결합을 포함하는 연결 모이어티(예를 들어, 이황화 결합의 절단은 단량체들 사이의 연결을 절단하지 않는다)는 본 발명의 구현예의 범위 이내이다. 이황화 결합이 없는 연결 모이어티의 잠재적 이점은 이황화 결합과 마찬가지로 완만하게 환원하는 조건(mildly reducing condition)에 의한 절단에 영향을 받지 않는다는 것이다.
- [0095] 연결 모이어티는 또한 본원에서 가교 모이어티(cross-linking moiety)로 지칭된다. 연결 모이어티에 의한 α -갈락토시다제 단량체의 연결은 본원에서 "가교 연결"로 지칭된다.
- [0096] 일부 구현예에서, 비교적 짧은 연결 모이어티는 상이한 α -갈락토시다제 단량체 사이의 가교에서 긴 연결 모이어티보다 덜 효과적일 수 있다.
- [0097] 따라서, 일부 구현예에 따르면, 연결 모이어티는 공유 결합, 화학 원자 또는 기(group)가 아닌, 오히려 브리징 모이어티이다(bridging moiety).
- [0098] 따라서, 일부 구현예에 따르면, 연결 모이어티는 적어도 10개 원자 길이, 선택적으로 적어도 20개 원자 길이,

선택적으로 적어도 23개 원자 길이, 선택적으로 적어도 50개 원자 길이, 선택적으로 적어도 100개 원자 길이, 선택적으로 적어도 300개 원자 길이, 선택적으로 적어도 400개 원자 길이, 선택적으로 적어도 500개 원자 길이, 선택적으로 적어도 600개 원자 길이, 선택적으로 적어도 700개 원자 길이, 선택적으로 적어도 800개 원자 길이 및 선택적으로 적어도 1000개 원자 길이이다. 일부 구현예에서, 연결 모이어티의 길이(원자의 수)는 10 내지 1000개 원자, 15 내지 800개 원자, 20 내지 600개 원자, 50 내지 500개 원자, 65 내지 400개 원자, 75 내지 350개 원자 및 80 내지 200개 원자 범위이다.

[0099] 특정 구현예에서, 연결 모이어티의 길이(원자의 수)는 20 내지 600개 원자이다. 다른 특정 구현예에서, 연결 모이어티의 길이(원자의 수)는 140개 원자이다.

[0100] 본원에서, 연결 모이어티의 길이(원자의 수로 표현될 때)는 연결 모이어티의 백본의 길이, 즉, 연결 모이어티를 통해 연결된 두 단량체의 각각의 잔기 사이에서 선형 사슬을 형성하는 원자의 수를 지칭한다.

[0101] 본 발명의 일부 측면에 따르면, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 단량체는 폴리(알킬렌) 글리콜 연결 모이어티를 통해 다른 하나와 공유적으로 결합된다, 예를 들어, 일부 구체예에서, 연결 모이어티는 폴리(알킬렌 글리콜) 사슬을 포함한다.

[0102] 본원에 사용된, 문구 "폴리(알킬렌 글리콜)"은 하기 일반식을 공유하는 폴리에테르 중합체의 군을 포함한다: $-O-[(CH_2)_m-O]_n-$, 여기서 m 은 각 알킬렌 글리콜 유닛에 존재하는 메틸렌 기의 수를 나타내고, n 은 반복 유닛의 수를 나타내므로 중합체의 크기 또는 길이를 나타낸다. 예를 들어, $m=2$ 일 때, 상기 중합체는 폴리에틸렌 글리콜로 지칭되고, $m=3$ 일 때, 상기 중합체는 폴리프로필렌 글리콜로 지칭된다. 일부 구현예에서, m 은 1보다 큰 정수(예를 들어, $m=2, 3, 4$ 등)이다.

[0103] 선택적으로, m 은 폴리(알킬렌 글리콜) 사슬의 유닛 사이에서 다양하다. 예를 들어, 폴리(알킬렌 글리콜) 사슬은 함께 연결된 에틸렌 글리콜($m=2$) 및 프로필렌 글리콜 ($m=3$) 유닛 모두를 포함할 수 있다.

[0104] 상기 폴리(알킬렌 글리콜)은 선택적으로 적어도 두 개의 작용기를 포함하며(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같음), 각 작용기는 α -갈락토시다제 단량체의 하나와 공유 결합을 형성한다. 상기 작용기는 선택적으로 폴리(알킬렌 글리콜)의 말단기(terminal group)이며, 따라서 폴리(알킬렌 글리콜)의 전체 길이는 두 작용기 사이에 놓인다.

[0105] 문구 "폴리(알킬렌 글리콜)"은 또한 산소 원자가 예를 들어 S, -NH- 등과 같은 다른 헤테로원자로 대체된, 이의 유사체(analog)를 포함한다. 이 용어는 중합체를 구성하는 하나 이상의 메틸렌기가 치환된 상기의 유도체를 추가로 포함한다. 메틸렌기의 예시적 치환체는 알킬(alkyl), 사이클로알킬(cycloalkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 알콕시(alkoxy), 하이드록시(hydroxy), 옥소(oxo), 티올(thiol) 및 티오알콕시(thioalkoxy) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0106] 본원에 사용된, 문구 "알킬렌 글리콜 유닛(alkylene glycol unit)"은 상기 기술한 바와 같이, 폴리(알킬렌 글리콜)의 백본 사슬을 형성하는 $-(CH_2)_m-O-$ 기 또는 이의 유사체를 포함하며, 상기 $(CH_2)_m$ (또는 이의 유사체)은 다른 알킬렌 글리콜 유닛 또는 α -갈락토시다제 단량체 모이어티(말단 유닛의 경우)에 속하는 헤테로원자에 결합되고, 상기 O (또는 이의 헤테로원자 유사체)는 다른 알킬렌 글리콜 유닛의 $(CH_2)_m$ (또는 이의 유사체)에 결합되거나, 또는 α -갈락토시다제 단량체와 결합을 형성하는 작용기에 결합된다.

[0107] 알킬렌 글리콜 유닛은 3개 이상의 인접한 알킬렌 글리콜 유닛에 연결되도록 분지될 수 있으며, 3개 이상의 인접한 알킬렌 글리콜 유닛의 각각은 폴리(알킬렌 글리콜) 사슬의 일부이다. 이러한 분지된 알킬렌 글리콜 유닛은 이의 헤테로원자를 통해 하나의 인접한 알킬렌 글리콜 유닛에 연결되고, 나머지 인접한 알킬렌 글리콜 유닛의 헤테로원자는 분지된 알킬렌 글리콜 유닛의 탄소 원자에 각각 연결된다.

[0108] 또한, 헤테로 원자(예를 들어, 질소)는 일부분인 알킬렌 글리콜 유닛의 하나 이상의 탄소 원자와 결합하여 분지된 알킬렌 글리콜 유닛을 형성할 수 있다 (예를 들어, $[-(CH_2)_m]_2N-$ 등).

[0109] 예시적인 구현예에서, 알킬렌 글리콜 단위의 적어도 50%는 동일하고, 예를 들어, 이들은 서로 동일한 헤테로원자(heteroatom) 및 동일한 m 값을 포함한다. 선택적으로, 알킬렌 글리콜 단위의 적어도 70%, 선택적으로 적어도 90% 및 선택적으로 100%는 동일하다. 예시적인 구현예에서, 동일한 알킬렌 글리콜 단위에 결합된 헤테로원자는 산소 원자이다. 또 다른 예시적인 구현예에서, m 은 동일한 단위에 대해 2이다.

- [0110] 일 구현예에서, 상기 링커는 단일의 직쇄 링커, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다.
- [0111] 본원에서 사용된, 용어 "폴리(에틸렌 글리콜)(poly(ethylene glycol))"은 상기 정의된 바와 같은 폴리(알킬렌 글리콜)을 기재하며, 여기서 알킬렌 글리콜 단위의 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90% 및 바람직하게 100%는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 이다. 유사하게, "에틸렌 글리콜 단위"라는 문구는 본원에서 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 의 단위로 정의된다. 임의의 구현예에 따라, 연결 모이어티는 하기 화학식을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 이의 유사체를 포함한다:
- [0112] $-\text{X}_1-(\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y})_n-\text{X}_2-$
- [0113] 상기에서 X_1 및 X_2 각각은 적어도 하나의 α -갈락토시다제 단량체와 공유 결합을 형성하는 작용기이고(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같음),
- [0114] Y 는 산소, 황 또는 NR_5 (선택적으로 산소)이며,
- [0115] n 은 더 높은 n 값이 또한 고려될지라도 선택적으로 1 내지 200 (선택적으로 5 내지 150, 및 선택적으로 40 내지 70)의 정수이고; 및
- [0116] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 하이드록시, 옥소, 티올 및 티오알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0117] 일부 구현예에서, n 은 적어도 5, 선택적으로 적어도 8, 선택적으로 적어도 15, 선택적으로 적어도 25, 및 선택적으로 적어도 40이다.
- [0118] 일부 구현예에서, n 은 200 이하, 선택적으로 150 이하, 및 선택적으로 70 이하이다.
- [0119] 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 이의 유사체는 선택적으로 공중합체(copolymer)를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 상기 화학식에서 $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ 단위는 모두 서로 동일하지 않다.
- [0121] 일부 구현예에서, $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ 단위의 적어도 50%는 동일하다. 선택적으로, $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ 단위의 적어도 70%, 선택적으로 적어도 90%, 및 선택적으로 100 %는 동일하다.
- [0122] 선택적으로, 연결 모이어티는 분지된다, 예를 들어, 상기 화학식에서 하나 이상의 $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ 단위에 대해, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 및 R_5 중 적어도 하나는 $-(\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y})_p-\text{X}_3$ 이고, 여기에서 R_1-R_4 및 Y 는 상기에서 정의된 바와 같고, p 는 n 에 대해 본원에서 정의된 정수(예를 들어, 1 내지 200)이고, X_3 은 X_1 및 X_2 에 대해 본원에서 정의된 바와 같다.
- [0123] 상기 작용기는 선택적으로 아마이드 결합, 아민 결합, 에스테르 결합 및/또는 에테르 결합과 같은 결합을 형성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0124] 예를 들어, 상기 작용기는 선택적으로 폴리펩티드의 질소 원자(예를 들어, 라이신 잔기 또는 N-말단에서)와의 아마이드 결합, 또는 폴리펩티드의 산소 원자(예를 들어, 세린, 트레오닌 또는 티로신 잔기에서)와의 에스테르 결합을 형성하는 카르보닐기(carbonyl group)를 포함할 수 있다.
- [0125] 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 작용기는 선택적으로 폴리펩티드의 카르보닐기(예를 들어, 글루타메이트 또는 아스파테이트 잔기 또는 C- 말단에서)와 아마이드 결합, 에스테르 결합 또는 티오에스테르 결합을 형성하는 헤테로원자(예를 들어, 질소, 황, 산소)를 포함할 수 있다. 선택적으로 또는 부가적으로, 상기 작용기는 폴리펩티드(예를 들어, 폴리펩티드 내의 헤테로원자)에 부착된 알킬 또는 아릴기를 포함할 수 있다.
- [0126] 선택적으로 또는 부가적으로, 상기 작용기는 선택적으로 α -갈락토시다제 단량체의 알킬기와 아민 결합을 형성하는 질소 원자를 포함할 수 있고, 또는 α -갈락토시다제 단량체는 선택적으로 작용기의 알킬기와 아민 결합을 형성하는 질소 원자를 포함할 수 있다. 이러한 아민 결합은 환원성 아민화(reductive amination)에 의해 형성될 수 있다 (예컨대, 하기에 기술됨).
- [0127] 일부 구현예에서, 상기 작용기 중 하나 이상은 폴리펩티드(예를 들어, 그안의 라이신 잔기)와 아마이드 결합을 형성한다.

- [0128] 상기 작용기는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0129] 일부 구현예에서, 작용기 중 적어도 하나는 폴리펩티드의 하나의 작용성(functionality)(예를 들어, 라이신 잔기 또는 N-말단의 아민기)에 부착되고, 작용기 중 적어도 하나는 폴리펩티드의 다른 작용성(를 들어, 시스테인 잔기의 티올기)에 부착된다.
- [0130] 일부 구현예에서, 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 그 서브단위 내의 라이신 잔기에 결합함으로써 단일 서브단위에만 결합된 추가의 PEG 모이어터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 이러한 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제의 생산 및 특성은 본 양수인에 의한 PCT 출원 W02011/107990에 상세히 기재되어 있다. 본원에 기술된 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 안정화되고 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제는 또한 본원에서 알파 (pegunigalsidase alfa)로도 지칭된다.
- [0131] 본원에 기재된 기술된 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 안정화되고 공유 결합된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제는 생물학적으로 활성이며, α -갈락토시다제 활성을 갖는다. 본원에 기술된 α -갈락토시다제 활성은 α -갈락토시다제의 특징(예를 들어, 기질의 말단 α -갈락토실 모이어터의 가수분해와 같은 α -갈락토시다제의 촉매 활성 특성)인 생물학적 활성이다.
- [0132] 일부 구현예에서, α -갈락토시다제의 촉매 활성은 포화시의 촉매 속도 (즉, V_{max} 값)가 특징이다. 대안적으로, α -갈락토시다제 활성은 파브리병의 관점에서 치료 활성과 같은 치료 활성(예를 들어, 치료 효과를 갖는 효소 활성)이다. 선택적으로, 상기 치료 활성은 실험 동물(예를 들어, 파브리 마우스) 및 선택적으로 인간 파브리 환자에서 결정된다.
- [0133] α -갈락토시다제의 활성을 결정하기 위한 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 전형적으로, α -갈락토시다제(즉, 본원에 기재된 천연 형태 또는 다량체성 단백질 구조)를 당업계에서 α -갈락토시다제의 기질로서 인식되는 화합물과 접촉시키고, 이어서 활성의 정도를 정량적으로 측정한다. α -갈락토시다제 활성을 특히 편리하게 검출할 수 있는 화합물은 당업계에 공지되어 있으며 상업적으로 이용할 수 있다.
- [0134] 일부 구현예에서, α -갈락토시다제 활성은 4-메틸움벨리페릴- α -D-갈락토피라노사이드 (4-methylumbelliferyl- α -D-galactopyranoside)의 가수분해를 실험하여 결정된다. 다른 구현예에서, α -갈락토시다제 활성은 p-니트로페닐 α -D-갈락토피라노사이드(p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside)의 가수분해를 실험하여 결정된다.
- [0135] 본원에 기재된 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질의 활성을 천연 α -갈락토시다제 활성과 비교할 때, 일부 특정 구현예에서, 천연 α -갈락토시다제는 바람직하게는 안정화되고, 공유 결합된 재조합 인간 α -갈락토시다제 단백질의 α -갈락토시다제 다량체와 실질적으로 동일한(예를 들어, 아미노산 서열 및 당화 패턴의 관점에서) α -갈락토시다제 다량체를 포함한다.
- [0136] 일부 구현예에 따르면, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 인간 개체의 생리학적 시스템에서 비가교된 α -갈락토시다제[예를 들어, 아갈시다제 알파(레프리갈[®], 샤이어) 및 아갈시다제 베타(파브라자임[®], 젠자임)]의 순환 반감기보다 더 높은 (예를 들어, 적어도 20%, 적어도 50% 더 높은, 적어도 100% 더 높은, 적어도 400% 더 높은, 적어도 900% 더 높은, 적어도 1500% 더 높은, 적어도 2000% 더 높은, 적어도 2500% 더 높은, 적어도 3000% 더 높은, 적어도 3500% 더 높은, 적어도 4000% 더 높은, 최소 5000% 더 높은, 최소 7500% 더 높은, 최소 8000% 더 높은, 10,000%까지 더 높은, 20,000%까지 더 높은, 50,000%까지 더 높은, 100,000% 더 높은, 200,000% 더 높은 또는 그이상) 순환 반감기가 특징이다.
- [0137] 본원에 기술된 바와 같이, 임상적 측면에서 시험하였을 때, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 순환 반감기는 IV 주입 후 현저히 연장되었다.
- [0138] 따라서, 본 발명의 일부 측면에 따르면, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 IV 주입 후 적어도 5시간, 적어도 10시간, 적어도 20시간, 적어도 50시간, 적어도 60시간, 적어도 70시간, 적어도 80시간 또는 적어도 90시간의 순환 반감기($T_{1/2}$)를 갖는다.
- [0139] 일부 구현예에서, 본 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 순환 반감기는 2 mg/kg체중의 정맥 투여 후 14일차에 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 혈장 농도가 상업적으로 이용가능한 재조합 인간 α -갈락토시다제(아갈시다제 베타, 파브라자임[®])의 1 mg/kg체중의 투여 후 2시간에 최대 혈장 농도의

규모와 동일한 정도이다.

- [0140] 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 순환 반감기($T_{1/2}$)는 환자에게 정맥 내로 투여되는 경우, IV 주입 후 적어도 5, 10, 20, 30, 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80 또는 적어도 90시간이다.
- [0141] 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 IV 주입 후 순환 반감기($T_{1/2}$)는 3 내지 100시간의 범위, 5 내지 70시간의 범위, 5 내지 50, 10 내지 45, 15 내지 40, 20 내지 35, 40 내지 69, 60 내지 80, 60 내지 90 및 25 내지 50시간의 범위이다.
- [0142] 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 순환 반감기($T_{1/2}$)는 5 내지 10 시간, 10 내지 20시간, 20 내지 50시간 또는 50 내지 80시간 또는 50 내지 90시간 사이이다.
- [0143] 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 생체이용률은 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ 또는 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 의 단위로 "곡선하면적(area under the curve)"($\text{AUC}_{0-\infty}$)으로 표현되는 투여 후 총 이용가능한 효소를 반영할 수 있다.
- [0144] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 1.0 mg/kg을 개체에 정맥 투여한 후 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 생체이용률(곡선하면적)은 10,000 내지 500,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 50,000 내지 250,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 10,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 25,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 50,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 75,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 100,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 또는 적어도 200,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 범위이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 생체이용률(곡선하면적)은 상기 제조합 인간 α -갈락토시다제의 1.0 mg/kg 투여 후에 100,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 이다.
- [0145] 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 2.0 mg/kg을 개체에 정맥 투여한 후 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 생체이용률(곡선하면적)은 50,000 내지 800,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 100,000 내지 600,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 150,000 내지 500,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 50,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 75,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 100,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 200,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 300,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 적어도 400,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 또는 적어도 600,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 범위이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 생체이용률(곡선하면적)은 상기 제조합 인간 α -갈락토시다제의 2.0 mg/kg 투여 후에 400,000 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 이다.
- [0146] 증가된 순환 반감기는 선택적으로 더 높은 생체내 안정성(예를 들어, 대사에 대한 내성), 표적 기관에서의 더 높은 흡수 및/또는 활성과 관련될 수 있다.
- [0147] 순환 반감기는 다양한 간격으로 생리학 시스템(예를 들어, 사람, 실험 동물)으로부터 샘플(예를 들어, 혈액 샘플)을 채취하고, 당업계에서 공지된 기술을 사용하여 샘플에서 α -갈락토시다제의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다.
- [0148] 조직 반감기는 다양한 간격으로 생리학 시스템(예를 들어, 사람, 실험 동물)으로부터 샘플(예를 들어, 조직 샘플)을 채취하고, 당업계에서 공지된 기술을 사용하여 샘플에서 α -갈락토시다제의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다.
- [0149] 선택적으로, 반감기는 말기 반감기(terminal half-life) (예를 들어, 실시예 섹션에서 설명된 바와 같음)로 계산되며, 여기서 반감기는 분포의 유사-평형(pseudo-equilibrium) 후 농도(예를 들어, 혈중 농도)가 50% 감소하는데 필요한 시간이다. 말기 반감기는 시간 대 로그 농도의 선형 회귀에 의해 시간 대 로그 농도의 말단 선형 부분으로부터 계산될 수 있다 (예를 들어, Toutain & Bousquet-Melou [J Vet Pharmacol Ther 2004, 27: 427-39] 참조). 따라서, 말기 반감기는 약물 제거율에 기인한 약물 혈장 농도의 감소의 척도이며, 다른 이유로 인한 감소가 아니라, 투여된 약물의 양이 반으로 떨어지는 데 필요한 시간일 필요는 없다.
- [0150] α -갈락토시다제(예를 들어, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 또는 비-가교된 α -갈락토시다제)의 수준을 측정하는 것은 α -갈락토시다제의 물리적 존재를 검출하는 것(예를 들어, α -갈락토시다제에 대한 항체를 포함) 및/또는 α -갈락토시다제 활성의 수준을 검출하는 것 (예를 들어, 본원에 기술된 바와 같음)을 포함할 수 있다.
- [0151] 본원에서, "인간 α -갈락토시다제(human α -galactosidase)"는 사람에서 자연적으로 발생하는 α -갈락토시다제 단백질의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한(예를 들어, 상기에 기술된 바와 같음) 아미노산 서열을 포함하는

식물 재조합 α -갈락토시다제를 의미한다.

- [0152] 본 발명의 사용에 적합한 α -GAL의 예로는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 α -GAL을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 선택적으로, 특정 구현예에서, α -GAL은 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, α -GAL은 서열번호 2 또는 서열번호 3 중 어느 하나일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 서열번호 2의 α -GAL 및 서열번호 3의 α -GAL 모두를 포함하는 식물 재조합 α -갈락토시다제 단백질의 조합을 포함하는 식물 재조합 α -갈락토시다제의 집단을 포함한다.
- [0153] 본원에 사용된, " α -갈락토시다제(α -galactosidase)"는 Gb3에서 갈락토스 모이어티에 대해 효소 활성(예를 들어, 가수분해)을 나타내는 임의의 단백질을 지칭한다 (예를 들어, α -갈락토시다제 A).
- [0154] 선택적으로, " α -갈락토시다제"는 E.C.3.2.1.22를 지칭한다. 본원에 사용된 "산성 α -갈락토시다제"는 리소좀에서 일어나는 바와 같이, 산성 pH 조건 (예를 들어, 약 pH 4.2 내지 5)에서 갈락토스-함유 올리고당으로부터 말단-연결된 α -갈락토스 모이어티를 가수분해하는 능력을 특징으로 하는 α -갈락토시다제를 지칭한다.
- [0155] 선택적으로, α -갈락토시다제 단백질은 적어도 하나의 만노스-6-인산 (mannose-6-phosphate, M6P) 모이어티를 추가로 포함한다. M6P 모이어티(또는 모이어티들)는 α -갈락토시다제 단백질의 하나 이상의 α -갈락토시다제 단량체에 연결될 수 있다(예를 들어, 링커를 통한).
- [0156] 생체분자(예를 들어, 폴리펩티드)에 M6P-함유 모이어티를 도입하는 기술 및 시약은 WO 2009/024977에 기술되어 있다.
- [0157] 본원에서 상세히 기술된 바와 같이, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 정맥 내 투여는 신장, 심장 및 환자(예를 들어, 통증) 점수를 포함하는 인간 환자에서의 임상 파라미터의 개선/안정화를 초래하였다.
- [0158] Gb3 당지질의 축적은 파브리병의 자연적 경과와 특징이며, 이의 축적의 감소는 파브리 환자에 대한 ERT에서 임상적 파라미터이다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 당지질 축적의 감소에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량을 투여하는 IV는 혈장 Gb3 및/또는 리소-Gb3 농도를 감소시킨다.
- [0159] 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량을 투여하는 IV는 개체자의 신장 과립 모세 혈관에서 Gb3 (당지질)을 감소시킨다.
- [0160] 특정 구현예에서, 상기 감소는 정량적 BLISS 점수에 따라 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 감소 또는 그 이상이다.
- [0161] 일부 구현예에서, 감소는 BLISS 스코어로 측정된다. 본 발명에 따른 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 투여에 반응한 Gb3 및/또는 리소 Gb3의 감소는 1개월, 2개월, 3개월, 5개월, 6개월, 1년 또는 그 이상의 치료 후에 측정된다. 일부 구현예에서, Gb3의 감소는 치료 시작 후 6개월에 측정했을 때, 치료 전(pre-treatment) Gb3과 비교하여 적어도 50%이다.
- [0162] 파브리 환자는 마찬가지로 통증 및 구체적으로 신경병증성 통증을 겪고, 본 발명의 방법 및 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 환자에서 파브리-관련 통증을 완화시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에 따르면, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량의 투여는 개체에서 통증을 감소시킨다. 많은 통증 설문지로 통증 감소를 평가할 수 있으며, 맥길 통증 설문지(McGill Pain Questionnaire), 파브리 통증 설문지 (Fabry Pain Questionnaire) 및 간이 통증 목록(Brief Pain Inventory)을 포함하는 비제한적 목록이 있다. 일부 구현예에서, 통증 감소는 Brief Pain Inventory에 따라 측정된다. 일부 구현예에서, 설문지에 따른 통증 감소는 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 그 이상이다. 특정 구현예에서, 통증 감소는 적어도 50% 감소이다. 본 발명에 따른 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 투여에 의한 통증의 감소는 1개월, 2개월, 3개월, 5개월, 6개월, 1년 또는 그 이상의 치료 후에 측정된다. 다른 구현예에서, 통증 파라미터의 감소는 치료 개시 후 6개월에 측정되고, 및/또는 치료 전 점수와 비교된다.
- [0163] 일부 구현예에서, 통증 감소는 각 치료 사이클 내에서 1주, 2주 및 3주에 측정된다. 일부 구현예에서, 통증 감소는 투여 후 2주차에 확인된다. 일부 구현예에서, 통증 감소는 투여 후 3주차에 확인된다.
- [0164] 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량의 투여는 개

체의 일반적 삶의 질에 대한 인식에 대한 개선을 제공한다. 많은 "삶의 질(quality of life)" 설문지를 치료 결과 평가에 사용할 수 있고, 맥길 삶의 질 설문지 (McGill Quality of Life Questionnaire), 삶의 질 스케일 (Quality of Life Scale, QOLS), 세계 보건기구 삶의 질 (WHO Quality of Life, WHOQOL) 및 EQ-5D-5L 설문지를 포함하는 비제한적 목록이 있다. 일부 구현예에서, 삶의 질은 건강의 5개 측면을 포함하는 EQ-5D-5L 설문지에 따라 측정된다: 이동성, 자가-관리 능력, 통상적인 활동 수행 능력, 통증 및 불편감 및 불안 및 우울증. 각 항목에는 5개의 선택 수준이 있다. 일부 구현예에서, 설문지에 따른 개선은 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 그 이상이다. 특정 구현예에서, 삶의 질 향상은 적어도 50% 개선이다. 본 발명에 따른 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 투여에 의한 삶의 질의 개선은 1개월, 2개월, 3개월, 5개월, 6개월, 1년 또는 그 이상의 치료 후에 측정된다. 다른 구현예에서, 삶의 질의 개선은 치료 개시 후 6개월에 측정되고, 및/또는 치료 전 점수와 비교된다.

- [0165] 신장 손상은 주로 세뇨관(kidney tubules)에 당지질의 축적에 의해 유발되는, 파브리병의 다른 일반적인 임상 합병증이며, 말기 신장 질환(renal disease)으로 이어지는 질병의 과정 동안 점진적인 저하가 특징이다.
- [0166] 본 발명의 상기 방법 및 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 환자에서 신장병증(nephropathy)의 진행을 늦추고 신장 기능의 안정화에 접근하거나, 또는 일정 수준의 신장 기능을 유지하는데 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에 따르면, 본 발명의 방법을 사용하여 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료학적 유효량을 투여하는 것은 개체에서 파브리 신장병증을 약화시킨다.
- [0167] 따라서, 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 방법을 사용하여 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료학적 유효량을 투여하는 것은 개체에서 일정한 수준의 신장 기능(nephropathic function)을 유지한다.
- [0168] 파브리 환자에서 신장 기능을 평가하는 방법은 실험적 마커(단백뇨, 미세알부민뇨, 만성 신장 질환 (CKD) 평가 등), 육안적 혈뇨(macrosopic hematuria), 생검, 생검 전자 현미경 검사, 손상된 신장 기능 및 신장 초음파 검사 및 MRI 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 신장 기능(및 손상된 신장 기능, 또는 신장병증)은 사구체 여과율(glomerular filtration rate) 및/또는 단백뇨 점수에 따라 측정된다. 사구체 여과율(GFR)은 단위 시간당 신장 사구체 모세 혈관으로부터 보먼 주머니(Bowman's capsule)로 여과된 체액의 부피이다. 사구체 여과율(GFR 또는 eGFR)을 계산하거나 추정하는 데 사용되는 여러 가지 상이한 기술이 있다. 임상 현장에서는, 혈청 크레아티닌 수준에 기초한 크레아티닌 제거 또는 크레아티닌 제거 추정치(estimated of creatinine clearance)가 GFR의 추정에 사용된다.
- [0169] MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) 공식 (4개 변수 사용: 혈청 크레아티닌, 나이, 민족 및 성별), 및 CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) 공식을 사용하는 추정 GFR(eGFR)에 대한 가장 일반적으로 사용되는 방법은 상기 MDRD 공식보다 더 정확한 공식을 만들기 위해 개발되었다.
- [0170] 일부 구현예에서, 신장 기능 악화의 약화가 있다. 본 발명의 일부 측면에 따른 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 정맥 투여에 반응한 신장 기능의 악화의 약화는 3개월, 6개월, 12개월, 24개월 또는 그 이상의 치료 후에 측정된다. 다른 구현예에서, 파브리-관련 신장 악화의 약화는 치료 개시 후 6개월에 측정되고, 및/또는 치료 전 점수와 비교된다.
- [0171] 특정 구현예에서, 신장 기능은 치료의 6개월, 12개월, 24개월 또는 그 이상의 이후에 추정 사구체 여과 속도 및/또는 단백뇨 점수를 사용하여 측정된 바와 같이, 치료가 개시될 때와 동일하거나 또는 유사한, 일정한 수준으로 유지된다.
- [0172] 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량의 투여는 개체에서 적어도 하나의 위장 파라미터를 개선한다. 일부 구현예에서, 위장 파라미터는 복통 및 복통의 빈도를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, GI 관련 징후와 증상의 빈도의 약화가 있다. 다른 구현예에서, 위장 파라미터의 감소는 치료 개시 후 6개월에 측정되고, 및/또는 치료 전 상태와 비교된다.
- [0173] 특정 실시 양태에서, 파브리-관련 위장 파라미터는 치료의 2개월, 4개월, 6개월, 12개월 또는 그 이상 후에 측정된 것과 같이, 유사한 일정 수준으로 유지된다.
- [0174] 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량의 투여는 개체에서 적어도 하나의 심장 파라미터(cardiac parameter)를 개선/안정화시킨다. 심장 파라미터는 ECG 성분, 심장 기능(예를 들어, 분출 분획), 부정맥 (arrhythmias), 판막 기능 부전(valvular malfunction) 및 심근 비대(cardiac hypertrophy)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 구현예에서, 심장 파라미터는 MRI로 측정된 LVM 및

LVMI이다. 본 발명의 일부 측면에 따른 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 IV 투여에 의한 심장 파라미터의 개선/안정화는 치료의 6개월, 12개월, 24개월 또는 그 이상 후에 측정된다. 다른 구현예에서, MRI로 측정된 LVM 또는 LVMI의 감소는 치료 개시 후 6개월에 측정되고, 및/또는 치료 전 값과 비교된다.

[0175] 특정 구현예에서, 심장 파라미터는 치료의 6개월, 12개월, 24개월 또는 그 이상 후에, 치료 개시에 측정된 것과 같은 일정한 수준으로 유지된다.

[0176] 다른 구현예에서, 환자의 파브리병 상태는 파브리병의 부담(burden), 병의 복합 징후 및 증상의 양을 정량하기 위한 도구인 마인츠 심각도 점수 지표(Mainz Severity Score Index, MSSI)에 의해 평가될 수 있다. 따라서, MSSI는 본 발명의 α -갈락토시다제 단백질 및 방법으로 처리된 환자에서 질병 상태를 평가하는데 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에 따르면, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량을 투여하는 것은 개체에서 안정적인 또는 개선된 MSSI 스코어를 유지한다. 본 발명의 일부 측면에 따른 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 투여에 의한 MSSI 점수는 치료의 6개월, 12개월, 24개월 또는 그 이상 후에 측정될 수 있다. 다른 구현예에서, MSSI의 감소는 치료 개시 후 6개월에 측정되고, 및/또는 치료 전 점수와 비교된다.

[0177] 다른 특정 구현예에서, MSSI로 측정된 환자의 파브리병 상태는 치료의 6개월, 12개월, 24개월 또는 그 이상 후에, 치료 개시에 측정된 것과 같은 일정한 수준으로 유지된다.

[0178] 본 발명의 구현예의 다른 측면에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 안정화되고 공유 결합된 식물 제조합 인간 α -갈락토시다제 단백질을 포함한다.

[0179] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본원에 기술된 본 발명의 하나 이상의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질과, 약제학적으로 허용가능하고 적합한 담체 및 부형제와 같은 다른 화학 성분의 제조(preparation)를 지칭한다. 약제학적 조성물의 목적은 유기체에 화합물을 투여하는 것을 용이하게 하는 것이다.

[0180] 이하, 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 유기체에 유의한 자극을 유발하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 배제하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 담체의 예는 프로필렌 글리콜, 식염수, 유제(emulsions) 및 유기 용매와 물의 혼합물뿐만 아니라 고체(예를 들어, 분말) 및 기체상 담체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0181] 본원에서 용어 "부형제"는 화합물의 투여를 더욱 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가된 불활성 물질(inert substance)을 지칭한다. 부형제의 예는 탄산 칼슘(calcium carbonate), 인산 칼슘(calcium phosphate), 다양한 당 및 전분 유형, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0182] 약제학적 조성물은 선택적으로 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 α -갈락토시다제를 추가로 안정화시키는 부가 성분을 포함한다. 선택적으로, 상기 부가 성분은 갈락토스이다.

[0183] 대안적으로, 갈락토스 대신 갈락토스 유도체(예를 들어, 갈락토오스-함유 글리코시드)가 사용될 수 있다. 선택적으로, 비-환원성 갈락토스 유도체가 사용된다.

[0184] 약물의 제형(formulation) 및 투여 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, PA, 최신판에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0185] 본 발명의 약제학적 조성물은 예를 들어 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정(dragee-making), 레비게이팅(levigating), 유화(emulsifying), 캡슐화, 포획 또는 동결건조 방법에 의해 당업계에 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

[0186] 따라서, 본 발명에 사용하기 위한 약제학적 조성물은 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제를 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로 가공하는 것을 용이하게 하는 부형제 및 보조제(auxiliary)를 포함하는 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 사용하는 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0187] 주사 또는 주입(infusion)을 위해, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 수성 용액, 바랍

직하게는 예를 들어 행크 용액, 링거 용액과 같은 생리학적으로 상용성이 있는 완충 용액, 또는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 유기용매를 포함하거나 포함하지 않는 생리학적 식염 완충용액으로 제형화될 수 있다.

[0188] 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 정맥내 투여(intravenous(IV) administration)를 위해 수성 유체 현탁액 또는 용액의 일부로 제형화될 수 있다. 본원에 기술된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 비경구 투여, 예를 들어, 볼루스 주사(bolus injection) 또는 연속 주입을 위해 제형화될 수 있다. 주사 또는 주입 제형은 단위 투여 형태(unit dosage form), 예를 들어, 앰플 또는 다회투여 용기에, 선택적으로 방부제를 첨가하여 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클 내의 현탁액, 용액 또는 유제일 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제(formulatory agent)를 함유할 수 있다.

[0189] 비경구 투여용 약제학적 조성물은 수-용해성 형태인 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 수용액을 포함한다. 또한, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 현탁액(suspension)은 적절한 유성 주사 현탁액 및 에멀전(예를 들어, 유중수형, 수중유형 또는 오일 에멀전 내의 유중수형)으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클(vehicle)은 참기름과 같은 지방성 오일 또는 에틸 올레에이트(ethyl oleate), 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르(synthetic fatty acids esters)를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 나트륨 카복시 메틸셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스 트란과 같은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다.

[0190] 선택적으로, 현탁액은 또한 고도로 농축된 용액의 제조를 허용하기 위해 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 용해도를 증가시키는 적합한 안정화제 또는 시약을 함유할 수 있다.

[0191] 본 발명의 제형은 본원에 기재된 방법 또는 파브리병을 치료하기 위한 다른 방법과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 제형은 피험자에게 투여하기 전에 추가로 희석될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 제형은 식염수로 희석되고 피험자에게 투여하기 전에 IV 백 또는 주사기에 함유될 것이다.

[0192] 전형적인 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 인간에게 정맥 투여용으로 적합한 약제학적 조성물로서 일상적 절차에 따라 제형화된다. 전형적으로, 정맥 투여용 조성물은 무균 등장성 수성 완충액 내의 용액이다. 필요한 경우, 약제는 또한 주입 부위에서 용해제와 통증을 완화시키기 위해 리그노카인(lignocaine)과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 별도로 공급되거나 또는 예를 들어, 활성 시약(active agent)의 양을 나타내는 앰플(ampoule) 또는 사쉴(sachette)과 같은 밀폐 봉인 용기 내의 건조된 동결건조 분말 또는 무수 농축물과 같은 단위 투여량 형태로 공급된다. 약제가 주입에 의해 투여되는 경우, 예를 들어 무균 의약 등급의 물 또는 식염수가 들어있는 주입 병으로 분배될 수 있다. 약제가 주사에 의해 투여되는 경우, 주사를 위한 멸균수 또는 생리 식염수의 앰플은 예를 들어 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0193] 대안적으로, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 사용하기 전에 예를 들어, 무균, 무-발열원 물과 같은 적합한 비히클로 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

[0194] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 또한 겔 상 담체 또는 부형제의 적합한 고체를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예는 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 다양한 당, 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 관점에서 사용하기 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하는데 효과적인 양으로 함유된 조성물을 포함한다. 보다 구체적으로, 치료학적 유효량은 질병의 증상을 예방, 경감 또는 완화시키거나, 피험자의 삶의 질 개선 또는 생존의 연장에 효과적인 본 발명의 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 양을 의미한다.

[0195] 본 발명의 방법에 사용된 임의의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제에 대하여, 치료적 유효량 또는 투여량은 동물의 활성 검정으로부터 초기에 측정될 수 있다.

[0196] 예를 들어, 활성 분석에 의해 결정된 IC_{50} 을 포함하는 순환 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 투여량을 제형화할 수 있다(예를 들어, 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질의 생물학적 활성의 반-최대 증가(half-maximal increase)를 달성하는 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질의 농도). 이러한 정보는 인간에게 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.

- [0197] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 구현예의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 0.1 mg/kg체중 내지 약 5.0 mg/kg체중 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0, 3.25, 3.50, 3.75, 4.0, 4.25, 4.50, 4.75 또는 5.00 mg/kg체중의 하나일 수 있다.
- [0198] 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 1.0 mg/kg체중이다. 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 2.0 mg/kg체중이다. 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 치료적 유효량은 5.0 mg/kg체중이다. 일반적으로, 본원에 기술된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 독성 및 치료 효능은 실험 동물에서 예를 들어, EC50, IC50 및 LD50 (시험된 동물의 50%에서 사망을 유발하는 치사 농도)를 결정하는 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 이러한 활성 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에 사용하기 위한 투여량 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다.
- [0199] 상기 투여량은 채택된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개인의 의사에 의해 선택될 수 있다 (Fingl 등, 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1, p.1 참조).
- [0200] 투여량 및 간격은 원하는 효과를 유지하기에 충분한 활성 모이어티의 혈장 수준을 제공하도록 개별적으로 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 20 내지 200 ml/시간의 속도로 정맥내 주입에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, 예를 들어, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 총 부피 150 ml로 전달되고, 2.0 mg/kg체중 미만 투여량의 경우, 주입 속도는 체중이 75 kg 미만인 환자에서는 37.5 또는 75 ml/시간일 수 있고, 체중이 75 kg 초과인 환자에서는 25.2 ml/시간일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 총 부피 350 ml로 전달되고, 2.0 mg/kg체중 미만 투여량의 경우, 주입 속도는 체중이 90 kg 미만인 환자에서는 58.2 ml/시간일 수 있고, 체중이 90 kg 초과인 환자에서는 개별적으로 정해진 속도일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 주입당 예를 들어, 70 kg까지인 환자에서는 150 ml 부피, 예를 들어, 70 내지 100 kg인 환자에서는 총 부피가 250 ml, 예를 들어, 100kg 초과인 환자의 경우 총 부피가 500 ml로 전달될 수 있고, 속도는 150 ml 주입에는 0.83 ml/분 (50 ml/시간), 250 ml 주입에는 1.38 ml/분 (82.2 ml/시간) 및 500 ml 주입에는 2.78 ml/분 (167 ml/시간)으로 전달될 수 있다.
- [0201] 주입 시간은 치료를 위해 환자의 내성을 관찰한 후에 변경될 수 있습니다. 일부 구현예에서, 주입 시간은 의사의 평가를 기초로 하여 1.5시간으로 점차적으로 감소될 수 있다.
- [0202] 일부 구현예에서, 주입 시간은 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 목적하는 투여량의 개시부터 완료까지 8시간까지 일 수 있다. 일부 구현예에서, 주입 시간은 1, 2, 3, 4.5, 5, 6, 7 또는 8시간이다. 경우에 따라 주입 시간은 개별 피험자의 개별 상황과 필요에 따라 8시간을 초과할 수 있다.
- [0203] 일부 구현예에서, (예를 들어, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 투여량이 2.0 mg/kg인 경우), 정맥내 투여는 H1 차단제 (디펜 하이드라민, 하이드록시진, 세트리진, 로라타딘, 데스로라타딘) 및 H2 차단제 (라니티딘, 시메티딘, 파모티딘)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 전약물 프로토콜(premedication protocol)과 함께 주입 시작의 12시간/또는 2시간 전 표준 용량으로 투여한다.
- [0204] 놀랍게도, 파브리 환자에게 투여했을 때, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 파브리 ERT에서 사용되는 통상적으로 이용가능한 α -갈락토시다제 제제와 비교하여, 우수하고 연장된 생체이용률 (이하 실시예 III-V 참조)을 나타냈다. 따라서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 투여 후 2주일 동안뿐만 아니라 정맥내 투여 후 3주 및 4주까지 지속적인 생체이용률을 가질 것이다.
- [0205] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 주입으로, 2주 이상(14일 $\pm$ 3일)의 투여 간격으로 정맥내 투여된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 2주 이상 (14일 $\pm$ 3일) 및 4주까지(28일, $\pm$ 3일)의 투여 간격으로 정맥 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 간격은 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일 (3주), 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 (4주), 29일, 30일, 31일 (1개월), 32일, 33일, 34일, 35일 (5주), 36일, 37일, 38일, 39일, 41일, 42일 (6주), 43일, 44일, 45일, 46일, 47일, 48일, 49일 (7주), 50일, 51일, 52일, 53일, 54일, 55일 또는 56일 (8주)의 하나일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 2주 이상 (14일 $\pm$ 3일) 및 8주까지(56일, $\pm$ 3일)의 투여 간격으로 정맥 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 본 발명의

안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 17일 내지 8주, 17일 내지 6주, 17일 내지 5주, 3주 내지 6주, 3주 내지 5주, 3주 내지 4주, 4주 내지 6주 또는 4주 내지 5주의 투여 간격으로 주입으로 정맥 내로 투여된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 6주 $\pm$ 3일에 1회 범위의 간격으로 정맥 내로 투여된다. 다른 구현예에서, 간격은 6주마다 1회이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 5주 $\pm$ 3일에 1회 범위의 간격으로 정맥 내로 투여된다. 다른 구현예에서, 간격은 5주마다 1회이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 4주 $\pm$ 3일 (예를 들어, 월간)에 1회 범위의 간격으로 정맥 내로 투여된다. 다른 구현예에서, 간격은 4 주마다 1회이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 단백질은 투여 사이에 3주 $\pm$ 3일의 간격으로 투여된다.

- [0206] 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 투여 사이에 3주의 간격으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 1.0 mg/kg체중의 투여량으로 투여 사이에 3주 간격으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 2.0 mg/kg체중의 투여량으로 투여 사이에 3주 간격으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 1.0 mg/kg체중의 투여량으로 투여 사이에 4주 간격으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 2.0 mg/kg체중의 투여량으로 투여 사이에 4주 간격으로 투여된다.
- [0207] 본 발명의 방법(예를 들어, 요법)에 따라 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 투여를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제는 정맥내 투여용으로 제형화된 단위 투약 형태, 또는 정맥내 투여(주입)용으로 제형화된 약제학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0208] 따라서, 본 발명의 일 측면에 따라, 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 2.0 내지 500 mg을 포함하는 단위 투여 형(unit dosage form)가 제공된다. 이 범위는 체중이 10 내지 250 kg인 환자에서 2주 이상 및 4주까지 간격으로 투여되는 최소 투여량을 2주 이상 및 4주까지 간격으로 투여되는 최대 투여량으로 하는 것을 목표로 한다.
- [0209] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 2.0 내지 500 mg을 포함한다.
- [0210] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 5.0 내지 470 mg을 포함한다.
- [0211] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 10.0 내지 450 mg을 포함한다.
- [0212] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 17.0 내지 425 mg을 포함한다.
- [0213] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 21.0 내지 400 mg을 포함한다.
- [0214] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 35.0 내지 370 mg을 포함한다.
- [0215] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 55.0 내지 340 mg을 포함한다.
- [0216] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 75.0 내지 300 mg을 포함한다.
- [0217] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 90.0 내지 270 mg을 포함한다.
- [0218] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 100.0 내지 225 mg을 포함한다.
- [0219] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 100.0 내지 200 mg을 포함한다.

- [0220] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 110.0 내지 190 mg을 포함한다.
- [0221] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 120.0 내지 175 mg을 포함한다.
- [0222] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 130.0 내지 150 mg을 포함한다.
- [0223] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 10 mg을 포함한다.
- [0224] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 30 mg을 포함한다.
- [0225] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 50 mg을 포함한다.
- [0226] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 75.0 mg을 포함한다.
- [0227] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 100.0 mg을 포함한다.
- [0228] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 125.0 mg을 포함한다.
- [0229] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 150.0 mg을 포함한다.
- [0230] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 175.0 mg을 포함한다.
- [0231] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 200.0 mg을 포함한다.
- [0232] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 250.0 mg을 포함한다.
- [0233] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 300.0 mg을 포함한다.
- [0234] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 350.0 mg을 포함한다.
- [0235] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 400.0 mg을 포함한다.
- [0236] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 430.0 mg을 포함한다.
- [0237] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 480.0 mg을 포함한다.
- [0238] 일 구현예에 따라, 단위 투약 형태는 인간 피험자에게 투여하기 위해 제형화된 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 500.0 mg을 포함한다.
- [0239] 본 발명에 따른, 사람 피험자에서 파브리병을 치료하는 방법은 파브리병에 대한 독립형 치료(stand-alone treatment)로서 제공될 수 있고, 추가 치료 옵션, 통상적 또는 비통상적 치료와 조합될 수 있다.
- [0240] 본 발명의 방법 또는 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제로의 치료에 적합한 파브리 환자는 또한 본 발명의 방법 또는 단백질의 치료를 받기 전, 치료 동안 또는 치료 후에, 예를 들어, 여기에 제한되지는 않으나,

미갈라스트 염산염(Migalastat hydrochloride)(Chappone Amicus Therapeutics), 이비글루스태트(Ibiglustat) INN) (글루코실 세라마이드 합성효소(glucosyl ceramide synthase, GCS) 저해제) (Genzyme Corp), 루세라스태트(Lucerastat) (INN)-피페라딘(piperadine) 유도체 (Actelion Ltd), NP-003-(당단백질-1(Glycoprotein-1) (MDR-1 또는 ABCB1) 저해제) (Neuraltus Pharmaceuticals, Inc), SBLSD-4- (유전자 치료(생체내 유전자 편집)-Sangamo BioSciences, Inc.), Genz-78132 (글루코실 세라마이드 합성효소(GCS) 저해제) (Genzyme Corporation), 미글루스태트(Miglustat)- (글루코실 세라마이드 합성효소(GCS) 저해제) (GlaxoSmithKline Plc and Actelion Ltd)와 같은 비 ERT 치료제를 받을 수 있다.

[0241] 본 발명의 방법 또는 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제로의 치료에 적합한 파브리 환자는 또한 치료 전 또는 후에 본 발명의 방법 또는 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제로의 ERT 치료제 및 여기에 제한되지는 않으나, 종래의 요법에서 파브라자임[®] 및 레프라갈[®] 또는 페구니갈시다제 알파와 같은 요법을 받을 수 있다. 본 발명의 방법 또는 단백질 치료에 적합한 환자 집단은 남성 및 여성 모두의 모든 연령대의 파브리 환자, 및 심각한 증상이 있거나 없는 파브리 환자, 느린 진행 환자, 파브리병을 가진 것으로 조기 진단된 환자 뿐만 아니라 젊은 환자, 젊은 환자 및 안정한 파브리병 환자를 포함한다.

[0242] 본원에 사용된, "안정한(steady)" 파브리 환자는 미리 결정된 기간에 걸쳐 파브리병 파라미터 중 적어도 하나의 수준을 유지하고 및/또는 상기 파라미터(예를 들어, 심장, 신장[eGFR 감소와 같은], 통증, 위장 및 바이오 마커 [혈장, 또는 소변 Gb3 및 리소-Gb3] 등과 같은)에서 유사한 악화 속도(rate of deterioration)를 유지하는 파브리 환자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 안정한 파브리 환자는 증상의 경증 내지 중증으로 신규 진단된 파브리 환자, 나이브 환자(naive patients) 및 이전에 파브리 질환으로 치료받은 환자를 포함하는 집단으로부터의 환자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 안정된 파브리 환자는 본 발명의 방법 및/또는 조성물로의 치료 개시 전에 안정한 환자를 포함한다. 투여되는 조성물의 양은 물론 치료되는 피험자, 고통의 심각도(severity of the affliction), 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 따라 달라질 것이다.

[0243] 본 발명의 조성물은 필요하다면, FDA/EMA (미국 식품 의약국(U.S. Food and Drug Administration)/유럽 의약청(European Medicinal Agency)) 승인 키트와 같은, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유하는 팩 또는 디스펜서 장치에 제공될 수 있다. 예를 들어, 팩은 블리스터 팩(blister pack) 또는 가압 용기(pressurized container)와 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여 지침이 수반될 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서는 또한 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관이 정한 양식으로 컨테이너와 관련된 고지를 수반할 수 있으며, 상기 고지는 인간 또는 수의학 투여에 대한 조성물의 형태 양식의 승인을 반영한 것이다. 예를 들어, 이러한 고지는 처방 의약품에 대해 미국 식품의약국(FDA) 승인 또는 승인된 제품 삽입물 또는 EMA에 의한 또는 기타 규제 기관의 승인을 받은 라벨일 수 있다. 상용성 약제학적 담체에 제제화된 본 발명의 일 구현예의 단백질 구조를 포함하는 조성물은 또한 본원에 설명된 바와 같이, 지시된 조건 또는 진단의 처치를 위해 준비되고, 적절한 용기에 위치되고, 표시될 수 있다.

[0244] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 선택된 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제에 따라, 본원에 기술된 약제학적 조성물은 전술한 바와 같이 포장 재료에 포장되고, 전술한 바와 같이 가교된 단백질 구조의 활성이 유익한 상태의 치료에 사용하기 위해, 포장 재료 내 또는 인쇄 상에 식별된다.

[0245] 일부 구현예에서, 포장재, 팩 또는 디스펜서, 키트 또는 용기는 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 또는 이를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하기 위한 지침을 포함하거나 또는 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여 지침은 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 또는 이를 포함하는 조성물을 함유하는 용기 및/또는 바이알에 부착된 라벨 내에 포함될 수 있다.

[0246] 사용 및 투여 지침은, 그중에서도(inter alia), 특정 증상 (예를 들어, 파브리병), 투여를 위한 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 또는 이를 포함하는 본 발명의 조성물의 제조를 위한 지시(direction), 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 또는 본 발명의 조성물의 투여에 대한 세부사항 및 투여 후 프로토콜, 및 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제 또는 이를 포함하는 본 발명의 조성물로 치료하기 위한 투여량 및 요법에 관한 세부사항을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 지침은 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제의 주입, 2주 이상(14일 $\pm$ 3일), 3주에 1회, 또는 4주 $\pm$ 3일(예를 들어, 매달마다)에 1회의 투여 간격으로서의 정맥내 투여에 대한 지시를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 지침은 4주마다 1회의 투여 간격으로 투여하기 위한 지침을 포함한다.

[0247] 추가의 구현예에서, 상기 지침은 본 발명의 안정화되고 공유 결합된 인간 α -갈락토시다제를 투여 사이에 3주 $\pm$

3일의 간격으로 투여하기 위한 지침을 포함한다.

- [0248] 본원에 사용된 용어 "약(about)"은 $\pm 10\%$ 를 지칭한다.
- [0249] 용어 "포함한다(comprises)", "포함하는(comprising)", "포함한다 (includes)", "포함하는(including)", "갖는(having)" 및 이들의 접합체 (conjugate)는 "포함하나 제한되지는 않는(including but not limited to)"을 의미한다.
- [0250] 용어 "이루어지는(consisting of)"은 "포함하고 제한되는(including and limited to)"을 의미한다.
- [0251] 본원에 사용된 단어 "예시적인(exemplary)"은 "실시예(example), 예시 (instance) 또는 설명(illustration)으로서 역할하는 것"을 의미한다. "예시적인"으로 기술된 임의의 구현예는 반드시 다른 구현예보다 바람직하거나 유리한 것으로 해석될 필요가 없고, 및/또는 다른 구현예로부터의 특징의 조합을 배제하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0252] 본원에 사용된 단어 "선택적으로(optionally)"는 "일부 구현예에서는 제공되며 다른 구현예에서는 제공되지 않는다"는 것을 의미한다. 본 발명의 임의의 특정 구현예는 그러한 특징들이 상충되지 않는 한 복수의 "선택적" 특징들을 포함할 수 있다.
- [0253] 본원에서 사용된, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 다르게 지시하지 않는 한 복수 인용 문헌을 포함한다. 예를 들어, "화합물(a compound)" 또는 "적어도 하나의 화합물(at least one compound)"이라는 용어는 이들의 혼합물을 포함하는, 복수 화합물을 포함할 수 있다.
- [0254] 본 출원 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 구현예가 범위 포맷(range format)으로 제시될 수 있다. 범위 포맷에서의 설명은 편의성 및 간략화를 위한 것이고 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되서는 안됨을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 설명은 가능한 모든 하위범위(subrange)뿐만 아니라 그 범위 내의 개별적인 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6과 같은 하위범위뿐만 아니라, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 및 6과 같은 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [0255] 본원에서 수치 범위가 제시될 때마다, 제시된 범위 내에서 임의의 인용된 수치(분수 또는 정수)를 포함하는 의미이다. 문구 제1 제시 숫자와 제2 제시 숫자의 "범위/범위 사이(ranging/ranges from)"와 제1 제시 숫자 "내지(to)" 제2 제시 숫자의 "범위/범위 사이"본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고 제1 및 제2 제시 숫자와 그 사이의 모든 분수 및 정수 수치를 포함한다.
- [0256] 본원에 사용된 용어 "방법(method)"은 주어진 작업을 수행하기 위하여 화학적, 약리학적, 생물학적, 생화학적 및 의학적 기술의 실무자에게 알려져 있거나, 또는 용이하게 개발될 수 있는 방식(manners), 수단(means), 기술 및 절차를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0257] 본원에 사용된 용어 "치료하는(treating)"은 상태의 진행을 없애는 것(abrogating), 실질적으로 억제, 지연 또는 역전시키는 것, 상태의 임상적 또는 심미적(aesthetical) 증상을 실질적으로 완화시키는 것 또는 상태의 임상적 또는 심미적 증상의 발현을 실질적으로 방지하는 것을 포함한다.
- [0258] 명확성을 위해, 개별 구체예와 관련하여 기술된 본 발명의 특정 특징은 또한 단일 구현예와 조합하여 제공될 수 있다. 반대로, 간략화를 위해, 단일 구현예와 관련하여 기술된 본 발명의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적절한 하위조합으로 또는 본 발명의 임의의 다른 기술된 구체예에 적합하게 제공될 수 있다. 다양한 구체예와 관련하여 기술된 특정 특징들은 구현예가 이들 요소없이 작동하지 않는 한, 그러한 구현예들의 본질적인 특징으로 간주되어서는 안된다.
- [0259] 본원에 상술되고 하기 청구범위에서 청구된 바와 같은 본 발명의 다양한 구체예 및 측면은 하기 실시예에서 실험적 지지를 얻는다.
- [0261] **실시예**
- [0262] 이제 본 발명의 일부 구현예를 비제한적으로 설명하는 상기 설명과 하기 실시예를 함께 참조한다.

- [0264] 실시예 1
- [0265] 임상 시험 프로토콜: 성인 파브리 환자에게 2주마다 정맥 주사로 투여되는 페구니갈시다제 알파의 안전성, 내약성(tolerability), 약물동태 (pharmacokinetics) 및 탐색 효율 파라미터를 평가하기 위한 1/2상, 오픈 라벨 (open label), 투여 범위 연구
- [0266] 이 연구는 대상 집단에서 bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alpha-GAL-1-CL45) (pegunigalsidase alfa)와 가공된 식물 재조합 인간 α-갈락토시다제의 안전성, 내약성, 약물동태 및 탐색 효율을 평가한다. 피험자(subject)는 α-GAL-A 활성(남성) 또는 유전적 테스트(여성)에 근거하여 파브리병의 확진 진단을 받았어야 하고, 지난 6개월 동안 ERT로 치료되지 않았어야 한다.
- [0267] 종점(endpoint)으로 선택된 파라미터는 질병과 가장 관련있는 파라미터였고, 안전한 약물동태 및 최종 종점에 대하여 유의미하고 관련있는 평가를 허용했다. 세 가지 용량 수준에 대한 연구는 안전성, 내약성 및 임상 결과에 관한 3가지 용량 수준의 중요한 정보를 제공했다.
- [0268] 연구 집단의 선별
- [0269] 포함 기준:
- [0270] 1. 증상이 있는 성인 파브리 환자 (18 세 이상, 남성 및 여성)
- [0271] 2. 남성: 정상의 하한치 미만인 혈장 및 림프구 α-갈락토시다제 활성(활성 시험에 의함)(혈장 내 LLN = 3.2 nmol/hr/mL, 백혈구의 LLN = 32 nmol/hr/mg/)
- [0272] 3. 여성: 파브리 돌연변이와 일치하는 병력 유전 테스트 결과
- [0273] 4. 소변 내 글로보트리아오실세라마이드 (Gb3) 농도 > 정상 상한치의 1.5배
- [0274] 5. 과거에 효소 대체 요법(ERT)을 전혀 받지 않은 환자, 또는 지난 6개월 동안 ERT를 받지 않았고 항 페구니갈시다제 알파 항체 검사가 음성인 환자
- [0275] 6. eGFR ≥ 60 mL/분/1.73 m²
- [0276] 7. 동의서 서명
- [0277] 8. 동반자가 아이를 낳을 수 있는 연령대의 여성 환자와 남성 환자는 리듬 방법(rhythm method)을 제외한 의학적으로 허용되는 피임 방법을 사용하기로 동의했다.
- [0278] 배제 기준:
- [0279] 다음 중 어느 하나라도 존재하면 등록 대상에서 제외하였다.
- [0280] 1. 연구 스크리닝 전 30일 이내에 연구 약물에 대한 임의의 임상 참여
- [0281] 2. 파브라자임[®] (아갈시다제-베타), 레프리갈[®] (아갈시다제-알파) 또는 파브리병 치료를 위한 임의의 다른 연구 약물 중 하나를 사용한 치료
- [0282] 3. 만성 신장 질환 3-5 단계 (CKD 3-5)
- [0283] 4. 투석이나 신장 이식의 병력
- [0284] 5. 스크리닝 전 4주간에 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 저해제 또는 안지오텐신 수용체 차단제 (ARB) 요법이 시작 또는 투여가 변경됨
- [0285] 6. MRI에 의한 심각한 심근 섬유증 (≥2 후기 증강(late-enhancement, LE) 양성 좌심실 부분) (Weidemann 등., 2009)
- [0286] 7. 임상적 뇌졸중의 병력
- [0287] 8. 임신 또는 수유(nursing)
- [0288] 9. HIV 및/또는 HBsAg 및/또는 C형 간염 감염의 유무
- [0289] 10. ERT에 대한 알려진 알레르기

- [0290] 11. 가돌리늄 기반 조영제에 대한 알려진 알레르기
- [0291] 12. 조사관 및/또는 의료 국장의 판단에 따라 환자가 연구 요건을 준수하는데 방해가 되는 의학적, 정서적, 행동적 또는 심리적 상태의 유무
- [0292] **약물 투여**
- [0293] 모든 주입(infusions)은 입원 중 필요하다면 외래 환자 모니터링을 위한 옵션으로 주입 후 관찰 기간과 함께 제공되었다.
- [0294] 3개의 치료 그룹이 피험자 집단을 구성했다. 치료군 I: 2주마다 0.2 mg/kg. 치료군 II: 2주마다 1 mg/kg. 치료군 III: 2주마다 2 mg/kg.
- [0295] 피험자(군당 4 내지 8명의 환자)는 2주, 14일마다 정맥내 주입을 받았다.
- [0296] **약물동태(pharmacokinetics, PK) 파라미터**
- [0297] 다음의 PK 파라미터는 혈장 농도 대 시간 프로파일에서 유도되며, 연구 약물의 프로파일을 결정하는데 사용된다: C_{max} , $t_{1/2}$, T_{max} , AUC_{0-t} 및 $AUC_{0-\infty}$. 샘플은 치료 1일차(첫번째 주입), 3M 방문 주입시, 6M 방문 주입시 및 12M 방문 주입시 채취되었다. PK를 위한 혈액은 다음 시점에서 채취하였다: 주입 전 (기준선); 주입 시작 1시간 후; 주입 종료시; 주입 후 1, 4, 8, 24, 48 ± 3 , 72 ± 3 , 96 ± 3 시간 및 2주 $\pm$ 3일 (마지막 혈액 샘플은 환자의 다음 주입 직전에 뽑았다).
- [0298] **효능 변수(들)(Efficacy Variable(s))**
- [0299] 종점 분석을 위해 평가되는 효능 파라미터는 하기와 같다:
- [0300] - 연구 동안 기준선 및 모든 주입시 혈장 및 소변 침전물에서의 Gb3 농도
- [0301] - 연구 동안 기준선 및 모든 주입시 혈장 글로보트리아오일스핑고신 (Globotriaosylsphingosine, Lyso-Gb3) 농도
- [0302] - 기준선 및 최종 주입시의 위장 증상 평가
- [0303] - 기준선 및 최종 주입시의 신장 기능 (eGFR 및 단백뇨)
- [0304] - 기준선 및 최종 주입시의 BPI(Short Form Brief Pain Inventory).
- [0305] 다음의 추가 절차는 기준선에서 선택적으로 수행되었다.
- [0306] - Gb3 농도에 대한 신장 생검
- [0307] - Gb3 농도에 대한 피부 펀치 생검
- [0308] - 심장과 뇌의 MRI
- [0309] - 마인츠 심각도 점수 지수 (MSSI)
- [0310] - 심장 기능 평가 (심초음파 및 스트레스 테스트)
- [0311] **안정성 변수**
- [0312] 안전성은 연구 약물의 투여 후에 임상적으로 유의한 검사실 이상, 기준선으로부터의 ECG 변화, 신체 검사 결과 및 주사 부위의 평가를 포함하는 치료-응급 AE(부작용)의 빈도, 심각성 및 지속 기간에 의해 평가되었다.
- [0313] 항-(폐구시갈시다제 알파) 항체는 다음 시점의 투여 전에 평가했다: 기준선, 매월, 마지막 주입시, 및 마지막 주입 후 1개월 및 3개월.
- [0314] 임상 검사실 평가(Clinical Laboratory Assessment)
- [0315] 다음 파라미터 또한 bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alpha-GAL-1-CL45, 폐구니갈시다제 알파)와 가교된 식물 제조합 인간 α -갈락토시다제의 투여 과정 동안 평가되었다:
- [0316] - 혈액학: 전혈 계수; 상이한 총 백혈구 계수 (호중구, 림프구, 단핵구, 호산구 및 호염기구), 총 적혈구 (헤모글로빈, 헤마토크릿, 평균 적혈구 부피, 평균 적혈구 혈색소량(mean corpuscular hemoglobin) 및 평균 적혈구

혈색소량 농도) 및 혈소판.

[0317] - 응고 프로파일: 프로트롬빈 시간(PT) 및 부분 트롬보플라스틴 시간(PTT)

[0318] - 생화학: 나트륨, 칼륨, 포도당, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 인산염 (무기산), 요산, 총 단백질, 알부민, 빌리루빈(총), 알칼리성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 아스파테이트 아미노전달효소(aspartate transaminase), 감마-글루타밀 전달효소(gamma-glutamyl transferase), 락테이트 탈수소효소(lactate dehydrogenase) 및 크레아틴 포스포키나아제(creatine phosphokinase)

[0319] - 소변 검사: 혈액, 포도당, 케톤 및 단백질 존재에 대한 덤스틱

[0320] **항-폐구니갈시다제 알파 항체**

[0321] 양성 IgG 항체 반응을 갖는 피험자에서 중화 항체를 포함하는 항-폐구니갈시다제 알파를 평가하였다.

[0322] **부작용 (Adverse Events, AE) 및 심각한 부작용 (Serious Adverse Events, SAE)**

[0323] 부작용(AE)은 임상 시험에 참여하는 피험자의 부작용으로 정의되며, 연구 약물과 관련이 있는지 여부와 관계없이 폐구니갈시다제 알파의 사용과 일시적으로 관련된 불리하고 의도하지 않은 징후, 증상 또는 질병을 포함한다. AE는 치료 시작부터 최종 방문 투여 후 90일까지 수집되었다. AE는 또한 우발적인 상해, 계획된 적정 이외의 임의의 약물(약물 및/또는 용량) 변경 이유, 병원 입원 이유, 또는 수술 절차의 이유 (사전 상태에 대한 사소한 선택 수술(elective surgery) 제외)를 포함한다.

[0324] **실시예 2**

[0325] **폐구니갈시다제 알파는 파브리병의 증상 감소에 안전하고 효과적이다**

[0326] 환자는 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg 및 2.0 mg/kg의 폐구니갈시다제 알파로 IV 치료 후 안전성(부작용) 및 임상 파라미터 향상에 대해 모니터링되었다. 안전성 데이터는 폐구니갈시다제 알파가 잘 견디고(tolerate), 18명의 환자 중 부작용(AE)의 발생률이 낮다는 것을 나타낸다. 폐구니갈시다제 알파는 또한 혈장과 신장 세뇨관 주위 모세혈관의 글로보트리아코실세라마이드(Gb3)를 감소시키는데 효과적이었다.

[0327] 혈장 Gb3 및 lysoGb3의 유의미한 감소는 폐구니갈시다제 알파 치료 6 개월 후 모니터링한 남성 환자에서도 관찰되었다. 신장 기능(eGFR 및 소변 단백질/크레아티닌)은 폐구니갈시다제 알파 치료를 통해 12개월 동안 모든 환자에서 안정적으로 유지되었다. 따라서, 격주로 투여되는 폐구니갈시다제 알파 치료는 명백하게 파브리 환자에게 안전하고 효과적이다.

[0328] **실시예 3**

[0329] **폐구니갈시다제 알파의 약물동태 프로파일: 가교는 폐구니갈시다제 알파의 생체이용률을 향상시킨다.**

[0330] 약물동태 파라미터는 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg 및 2.0 mg/kg의 폐구니갈시다제 알파를 투여받은 환자에서, 치료 1 일차(첫번째 주입), 3M 방문 IV 주입시 6M 방문 IV 주입시, 및 12M 방문 IV 주입시에 폐구니갈시다제 알파 혈장 수준에 근거하여 모니터링하였다. PK를 위한 혈액은 투여 직전 및 치료 사이의 14일에 걸쳐 채취되었다.

[0331] 효소의 유의미한 혈장 농도(항-폐구니갈시다제 알파 항체를 사용한 면역 측정법으로 측정함)는 용량 의존적인 방식으로 모든 투여량에 대해 투여 후 전체 14일 동안 명확하게 검출 가능했다 (도 1 참조). 모든 투여량에서, 혈장 농도는 투여 직후 최고조에 달했고, 다음 14일 동안 느리고 꾸준한 감소를 보였다. 도 2는 투여 후 임상적으로 승인된 상업적 아갈시다제 베타 (r-alphaGalA, 포유류 세포 재조합 인간 α -GAL A, 파브라자임™, 젠자임, Cambridge MA)의 혈장 농도에 대한 약물동태 프로파일을 나타낸다. 폐구니갈시다제 알파의 약물동태 프로파일과는 아주 대조적으로, 아갈시다제 베타는 그래프에서 알 수 있듯이 투여 후 10시간까지 환자의 혈장에서 간신히 검출가능하다. 따라서, 폐구니갈시다제 알파는 현저히 향상된 생체이용률을 갖는 것으로 보이며, 본원에 기술된 14일보다 더 연장되고, 임상적으로 승인된 파브라자임보다 명백하게 뛰어나다.

[0332] 특정 약물동태 변수를 평가할 때, 폐구니갈시다제 알파의 이점은 더욱 분명해진다. 투여 후 효소의 최대 혈장 농도(C_{max} , 도 3A) 및 총 생체 이용률 (혈장 대 시간 곡선 아래 면적, 무한대로 외삽됨(extrapolated to infinity), $AUC_{0-\infty}$, 혈장 mL당 질량(예를 들어, μ g 또는 ng) 효소 x 시간(예를 들어, 분 또는 시간)으로 표시됨, 도 3C) 모두는 용량 의존적이며, 도 1에 예시된 전체 약물동태 프로파일과 일치한다. 아갈시다제 베타와 비교했을 때, 폐구니갈시다제 알파의 C_{max} 와 $AUC_{0-\infty}$ 는 상업적으로 이용가능한 효소보다 분명히 우수하다.

[0333] 페구니갈시다제 알파의 반감기($t_{1/2}$)는 모든 투여량에서, 임상적으로 승인되고, 상업적으로 이용가능한 아갈시다제 베타(파브라자임™, 젠자임, Cambridge MA) 및 아갈시다제 알파(레프리갈™, 샤이어 휴먼 제네틱 테라피스 (HGT), Inc., Cambridge, MA, USA) (도 3B)보다 거의 두 배 규모 이상이었다.

[0334] 하기 표 1은 페구니갈시다제 알파의 약물동태 파라미터에 대한 상세한 값을 나타낸다. 표 1: 페구니갈시다제 알파의 약물동태 파라미터

표 1

투여량 (n)	평균 ± 표준편차			
	AUC _{0-Δ}	C _{max}	C _{2wk}	t _{1/2}
	(ng*hr/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(시간)
0.2 mg/kg	70,070 ± 10,632	1,858 ± 217	21.0 ± 10.5	60.3 ± 8.0
1 mg/kg	390,896 ± 55,716	11,123 ± 984	130 ± 28	78.9 ± 4.2
2 mg/kg	619,393 ± 79,281	16,625 ± 2,150	193 ± 142	70.7 ± 9.0

[0336] 페구니갈시다제 알파의 반감기를 고려한 14일 경과 후 14일에서의 혈장 농도의 외삽(extrapolation)은(도 3B 참조), 21일차와 28일차 또는 이후에도 상당한 유효한 치료량이 환자의 혈장에 남아 있는 것으로 예상된다는 것을 나타낸다.

[0337] 실시예 4

[0338] 가교된 prh-alpha-GAL-I-CL45의 면역원성 및 생체이용률

[0339] 혈청 샘플은 처음 4개월 동안은 1개월에 1회, 이후에는 2개월마다 1회씩 채취하였다. 144개의 샘플을 분석한 결과 123개가 항-약물 항체 (anti-drug antibody, ADA)가 음성이었다. 확인된 양성 샘플은 중화 활성, 항-글리칸 및 항 PEG 항체에 대해 추가로 분석하였다.

[0340] 항-가교된 prh-alpha-GAL-1-CL45 항체 형성의 빈도는 낮았다. 적어도 1회 방문에서 3명의 환자(19%)의 환자가 ADA 양성인 것으로 밝혀졌으며, 3명 중 2명은 중화 항체를 갖고 있다. ADA의 존재는 일시적이었고, 6 내지 15개월의 치료 후 ADA는 발견되지 않았다. 유의하게, 12개월 치료 후, 가교된 prh-alpha-GAL-1-CL45를 2.0 mg/kg 투여받은 집단의 환자에서는 치료-유도성(treatment-induced) 가교된 prh-alpha-GAL-1-CL45 항체가 발생하지 않았다.

[0341] 단일 가설에 국한되지 않고, 이러한 결과는 가교된 prh-alpha-GAL-1-CL45로의 반복된 치료가 개선된 안정성으로 인해 지속적인 노출을 제공하여 면역 내성(immune tolerance)을 유도할 수 있음을 시사한다.

[0342] 실시예 5

[0343] 가교된 페구니갈시다제 알파의 향상된 약물동태 및 연장 투여 요법: 연구를 통한 다기관 오픈 라벨 스위치

[0344] 파브리병 환자를 위한 기존의 효소 대체 요법은 치료 사이에 2주(14일)의 최대 간격으로 약물의 투여를 필요로 한다. 치료의 임상적 유효성의 현저한 감소 또는 치료-관련 부작용의 증가없이 치료 사이 간격을 연장하는 것은 개입 횟수를 줄이고 환자 순응도를 향상시킬 수 있어 중대한 임상적 중요성을 가질 수 있다. 페구니갈시다제 알파의 격주(bi-weekly) 주입을 받는 파브리병 환자에서 관찰되는 향상된 약물동태에 비추어 볼 때, 연장 투여 요법(extended dosage regimen)의 효과가 평가될 수 있다.

[0345] 연구를 위한 환자 선별은 하기를 포함하되 이에 국한되지 않는 포함 및 제외 기준 옵션에 따라 이루어졌다: 심각한 증상이 없는 파브리 환자의 치료, 비교적 느리게 진행되는 환자, 조기 진단된 환자, 꾸준한 질병 증상을 유지하거나 또는 선택된 기간 동안 유사한 악화 속도를 유지하는 환자.

[0346] 예시적인 연구 포함 기준은, 예를 들어, α-갈락토시다제 활성 및 유전적 테스트에 의해 정의된 바와 같이 파브리병으로 확진된 환자, 예를 들어, 환자의 eCFR 및 eGFR 기율기에 따라 정의된 바와 같이 mild to moderate 증상을 갖는 환자, 16-65세 환자, ERT 시행 후 적어도 3년인 환자를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0347] 임상 실험 평가, 안전성 및 효능 변수와 부작용의 모니터링, 약물동태 파라미터의 기록은 실시예 1에서 상세히 설명한 바와 같이 수행되며, 치료 사이 연장된 간격이 필요하면 변경된다 (예를 들어, 샘플은 처음 및 마지막 주입시 시간 포인트에서 채취된다: 주입 전(기준선)); 주입 시작 후 1시간; 주입 종료시; 주입 후(post-

infusion) 1, 4, 8, 24, 48 ± 3 , 72 ± 3 , 96 ± 3 시간, 2주 $\pm$ 3일 및 3주 $\pm$ 3일 (마지막 혈액 샘플은 두번째 주입 직전에 채취될 것이다).

[0348] 선택적으로, 샘플은 또한 주입 후 2번째 및 3번째 주 사이 간격, 및 추가로 선택적으로 주입 후 3주보다 넓은 시점, 예를 들어 주입 후 4주 $\pm$ 3일 및/또는 주입 후 3번째 내지 4번째 주 간격 시점에서 채취될 수 있다.

[0349] 3주마다(tri-weekly) 또는 4주마다(four-weekly) 투여량, 또는 주입 후 2주 이상 임의 투여량을 받은 환자에서 현저한 부작용이 없고 임상 파라미터는 만족할만한 또는 유사한 수준으로 유지되면서, 지속적인 페구니갈시다제 알파의 치료적 혈장 수준은 예를 들어 이들의 이전의 ERT 치료와 마찬가지로, 치료 과정에 걸친 임상 파라미터는 페구니갈시다제 알파를 이용하는 파브리병의 효소 대체 요법에 대한 연장된 투여 요법의 새롭고 개선된 프로토콜의 기초를 구성할 수 있다. 주입 사이의 최적 간격은 임상 데이터 및 약물동태 파라미터의 분석으로부터 결정될 수 있다(또는 추정될 수 있다).

[0350] 실시예 6

[0351] 페구니갈시다제 알파 2 mg/kg 대 파브라자임® 1 mg/kg의 투여 분석:

[0352] 투여 간격을 2 주에서 3주 또는 4주로 연장했을 때 페구니갈시다제 알파의 약물동태 특성을 결정하고, 추정 페구니갈시다제 알파 노출(estimated pegunigalsidase alfa exposure)과 추정 파브라자임 노출을 비교하기 위해, 투여 분석(projection analysis)이 수행되었다.

[0353] 가교 prh-alpha-GAL-I-CL45 (페구니갈시다제 알파)의 동역학

[0354] 실시예 1에 나타난 페구니갈시다제 알파 2 mg/kg을 투여받은 환자(n=4)의 데이터는 페구니갈시다제 알파에 대한 투여의 주요 부분으로 사용했다. 투여는 일반적으로 선형 투여량-비례성(linear dose-proportionality)에 의존한다. 이 투여의 출발점으로 3개월 데이터가 선택되었다. 4명의 피험자에 대한 3개월 반감기는 70.1에서 105 시간 범위였다.

[0355] 페구니갈시다제 알파의 이전 투여량으로 인해 3개월 시점에 측정 가능한 농도의 이전 투여량(pre-dose)이 있었기 때문에, 각 피험자의 말단 제거율(terminal elimination rate, λ_z) 값을 사용하여 이전 투여량 농도를 샘플링 시간의 각각에 외삽했다(extrapolated). 이들 외삽된 농도를 측정된 농도에서 뺀 후 3개월 시점에 투여한 농도에 기인하는 농도에 도달했다. 각 피험자에 대한 조정된 3개월 데이터는 피닉스 윈논린 소프트웨어(Phoenix WinNonlin Software)를 사용하는 2-구획 모델(2-compartment model)에 적합했다. 모델 변수에 대한 평균 추정치는 2주, 3주 또는 4주 간격에서 2 mg/kg의 3개 성공적 투여량을 시뮬레이팅하는데 사용되었다. 가상 주입 시간은 6시간이었다. C_{max} , AUC_{tau} (투여 사이의 시간에 대한 면적) 및 C_{min} (후속 투여 전의 농도)에 대한 값을 표 2에 나타내었다.

[0356] 표 2. 투여에 대한 약물동태 파라미터

표 2

간격	1 st 투여 (2 mg/kg)			
	C_{max} (ng/mL)	AUC_{tau} (ng·hr/mL)	C_{ave}^* (ng/mL)	C_{min}^{**} (ng/mL)
q 2주	22,213	1,108,471	3,299	207
q 3주	22,213	1,123,108	2,228	25
q 4주	22,213	1,124,907	1,457	3

[0358] * 2주, 3주 또는 4주 투여 간격에 대한 평균 농도.

[0359] ** 다음 투여 전의 마지막 샘플링 시간 시점의 농도; 주입 시작 후 2주, 3주 또는 4주.

[0360] 파브라자임의 약물동태

[0361] 파브라자임 PK 파라미터는 패키지 삽입물 및 Eng et al, 2001 (Am J Hum Genet, 68: 711-722)의 간행물에서 취득하였다(도 2).

[0362] 부분 AUC 및 C_{ave}

[0363] 표 3은 2주마다 1 mg/kg의 페구니갈시다제 알파 및 파브라자임의 다양한 투약 요법 후에 투여된 약물동태 파라미터의 비교를 나타낸다. 페구니갈시다제 알파에 대한 데이터는 진행중인 I/II 연구에서 획득하였다. 파브라자임의 약물동태 특성에 대한 정보는 패키지 삽입물 및 Eng et al, 2001 (Am J Hum Genet, 68: 711-722)의 간행물에서 이용가능하다. 투여 모델링은 피닉스 윈론된 소프트웨어 (버전 6.3)를 사용하여 수행되었다. 주간 부분 AUC 및 C_{ave} 계산을 통해 페구니갈시다제 알파의 1, 2, 3, 4주에 대한 약물 가용성의 비교 평가/추정 및 2주마다 파브라자임과의 비교가 가능해졌다.

[0364] 상기 데이터는 주당 계산되고 순차적으로 표시된다. 두꺼운 선은 반복 투여의 시간을 나타낸다. 따라서, 2주간격에 대하여, 3번째, 5번째 및 7번째 라인은 투여량 투여를 나타내고, 3주 간격에 대하여 4번째, 7번째 및 10번째 라인은 투여량 투여를 나타낸다. 회색 및 흰색 상자는 다른 주입 간격을 시각적으로 정의한다. 168시간(1주) 및 336시간(2주)의 평균 주간 효소 농도를 삽입하거나(interpolate) 외삽하여 주당 약물 수용 범위(drug coverage by week)를 추정하였다. 표에 개시되어 있다: 2주, 3주, 또는 4주마다의 페구니갈시다제 알파 2 mg/kg에 대하여, 주간 C_{ave} 값 (각각 709, 87 및 11 ng/mL)은 파브라자임의 무시할 수 있는 2주제 C_{ave} 값에 비해 유의미하게 높았다.

[0365] 주입 후 10시간 뒤 파브라자임의 C_{ave} 수준은 2 mg/kg, 4주마다 투여 후 4주제 페구니갈시다제 알파의 추정 C_{ave} 수준(11 ng/mL)과 유사하다.

[0366] 도 4A는 페구니갈시다제 알파 2 mg/kg의 단일 주입 후 4주 기간 동안 외삽된 효소 가용성(혈장 농도)을 도시한다. 4주 기간 동안 페구니갈시다제 알파로 치료한 후 투여된 AUC(projected AUC)를 격주로 투여한 파브라자임과 비교하면, 동일한 기간 동안, 페구니갈시다제 알파에 대한 효소 가용성의 유지가 파브라자임보다 우수하다는 것이 명백하다(도 4B 참조, 구체적으로 삽도).

[0367] 상기 결과는 파브라자임과는 달리, 3주 및 4주 주입 간격으로 2 mg/kg의 페구니갈시다제 알파를 투여한 후, 유의미한 수준의 효소가 전체 치료 기간 동안 순환에 남아있을 것으로 예상되고, 표적기관에 도달할 수 있음을 보여준다.

[0368] 표 3. 치료의 12주 동안 주당 부분 면적 및 C_{ave}

표 3

	파브라자임, 1 mg/kg,		페구니갈시다제 알파, 2 mg/kg,					
	q 2주		q 2주		q 3주		q 4주	
시간 (주)	부분 AUC (주(week)) (ng*hr/mL)	주당 C_{ave} (ng/mL)	부분 AUC (주) (ng*hr/mL)	주당 C_{ave} (ng/mL)	부분 AUC (주) (ng*hr/mL)	주당 C_{ave} (ng/mL)	부분 AUC (주)(ng*hr/mL)	주당 C_{ave} (ng/mL)
1	11,667	69	989,406	5,889	989,406	5,889	989,406	5,889
2	nil	nil	119,065	709	119,065	709	119,065	709
3	11,667	69	1,004,012	5,976	14,637	87	14,637	87
4	nil	nil	120,864	719	991,201	5,900	1,799	11
5	11,667	69	1,004,233	5,978	119,266	710	989,627	5,891
6	nil	nil	120,892	720	14,664	87	119,092	709
7	11,667	69	1,004,233	5,978	991,205	5,900	14,640	87
8	nil	nil	120,892	720	119,287	710	1,800	11
9	11,667	69	1,004,233	5,978	14,664	87	989,627	5,891
10	nil	nil	120,892	720	991,205	5,900	119,092	709
11	11,667	69	1,004,233	5,978	119,287	710	14,640	87
12	nil	nil	120,892	720	14,664	87	1,800	11

[0369]

[0370] 함께 제공된 바와 같이, 본원에서 제공된 결과는 가교된 α -갈락토시다제 페구니갈시다제 알파의 약물동태 특성

이 포유류 세포-유래된 현재 승인되고, 상업적으로 이용가능한 파브리 ERT 아갈시다제 베타 (파브라자임TM, 젠자임, Cambridge MA) 및 아갈시다제 알파(레프리갈TM, 샤이어 휴먼 제네틱 테라피스 (HGT), Inc., Cambridge, MA, USA) 모두와 상이하고 비교시 이점이 있음을 의미한다. 페구니갈시다제 알파의 모든 투여량에서 관찰되는 더 긴 반감기($t_{1/2}$) 및 실질적으로 더 큰 전체 생체가용율($AUC_{0-\Delta}$)은 주입(투여) 사이 2주에 걸쳐 이용가능한 활성 효소의 존재를 반영한다. 개선된 약물동태 프로파일은 파브리병에 대한 효과적인 장기간 효소 대체 요법에 적합하고 적어도 2주 내지 4주 간격으로 투여 될 수 있음을 나타낸다.

[0371] 실시예 7

[0372] 임상 시험 프로토콜: 3상, 오픈 라벨, 현재 ERT로 치료받는 성인 파브리 환자에게 정맥 주입으로 투여되는 페구니갈시다제 알파의 안전성, 효능 및 약물 동태를 평가하는 연구로 스위치: 파브라자임[®](아갈시다제 베타) 또는 레프리갈[®](아갈시다제 알파)

[0373] 이 연구는 상업적으로 이용가능한 ERT (아갈시다제 알파 또는 아갈시다제 베타)로 현재 치료 받은 파브리병을 갖는 환자에서 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제(prh- α -GAL-I-CL45)(페구니갈시다제 알파)의 안전성, 효능 및 약물동태를 평가한다. 피험자는 질병의 징후와 함께 α -GAL-A 활성(남성) 또는 유전적 검사(여성)에 기초한 파브리병의 진단의 확인이 요구되고, 적어도 3년 동안 ERT로 치료를 받아야 한다.

[0374] 상기 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제(prh- α -GAL-I-CL45)(페구니갈시다제 알파)는 52주 동안 4주마다 2 mg/kg의 투여량으로 투여될 것이다. 종점으로 선택된 파라미터는 질병과 가장 관련있는 파라미터이고 안전성, 약물동태 및 효능 종점에 대한 중요하고 적절한 평가를 허용한다.

[0375] 약물 투여량 및 투여:

[0376] 적격성이 확인되면, 환자는 4주마다 정맥 내 투여되는 페구니갈시다제 알파 2 mg/kg으로 전환되어야 한다. 페구니갈시다제 알파의 주입 시간은 환자의 내약성, 조사자 평가 및 후원자 의료 모니터/감독의 승인 및 사용된 이전 약물을 점진적으로 줄이려고 시도한 후 환자의 체중에 따라 다양하다.

[0377] 약물동태 파라미터

[0378] 다음의 PK 파라미터는 연구 약물의 프로파일을 결정하기 위해 혈장 농도 대 시간 프로파일에서 유도된다: C_{max} , $t_{1/2}$, T_{max} , AUC_{0-t} 및 $AUC_{0-\Delta}$. PK 분석을 위한 혈액은 1일 및 치료의 종료 시점 (52주)에 채취된다.

[0379] 혈액을 채취하는 날, 혈액 샘플은 다음과 같은 시점에서 채취한다: 주입 전(기준선); 주입 시작 후 1시간; 주입 종료시; 주입 후 1 ± 0.25 , 2 ± 0.25 , 4 ± 0.25 , 8 ± 0.25 , 24 ± 0.5 , 48 ± 3 및 96 ± 3 시간 및 주입 후 14 ± 3 , 21 ± 3 및 28 ± 3 일(마지막 혈액 샘플은 환자의 다음 주입 직전에 뽑는다)(28일 이내에 총 13개 시점).

[0380] 효능 변수(들)

[0381] 종점 분석을 위해 평가되는 효능 파라미터는 다음과 같다:

- [0382] 1. 추정 사구체 여과율 (eGFRCKD-EPI)
- [0383] 2. 심초음파에 의한 좌심실 질량 지수 (g/m^2)
- [0384] 3. 혈장 내 글로보트리아오실스핑고신 (Lyso-Gb3) 농도
- [0385] 4. 혈장 내 Gb3 농도
- [0386] 5. 소변 Lyso-Gb3
- [0387] 6. 단백질/크레아티닌 비율 스팟 소변 검사
- [0388] 7. 사용된 진통제의 빈도
- [0389] 8. 운동 내성 (스트레스 테스트)
- [0390] 9. 간이 간략 통증 목록 (BPI)
- [0391] 10. 마인츠 심각도 점수 지수 (MSSI)

[0392] 11. 삶의 질 EQ-5D-5L

[0393] 안전성 변수

[0394] 안전성은 기준으로부터의 변화에 의해 평가하였다: 임상 시험 테스트, 신체 검사, 약물 투여 후 주사 부위의 평가, 심전도(ECG), 치료-응급 AE (부작용)의 빈도, 심각도 및 지속기간, 이전 약물(pre-medication) 주입을 점차 줄이는 능력, 주입 반응을 종합적으로 관리하기 위한 이전 약물의 사용을 위한 요구 사항 및 치료-유도성 항-폐구시갈시다제 알파 항체.

[0395] 이전의 결과는 격주 주입(투여) 요법에서 모든 투여량에 대해 폐구시갈시다제 알파의 보다 긴 반감기($t_{1/2}$) 및 실질적으로 더 큰 전체 생체이용률($AUC_{0-\infty}$)을 나타냈다. 확장된 투여 간격은 파브리병에 대한 ERT의 편의성, 비용, 순응도 (compliance rate) 및 불리한 효과의 빈도에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 파브리병에 대하여 효과적인 장기간 효소 대체 요법을 위한 bis-NHS-PEG₄₅와 가교된 식물 재조합 인간 α -갈락토시다제 (prh-alpha-GAL-1-CL45) (폐구시갈시다제 알파)의 적합성을 평가하기 위해, 폐구시갈시다제 알파는 4주 간격으로 주입된다.

[0396] 오픈 라벨 스위치오버 연구에서 이전에 적어도 3년 및 적어도 지난 6개월 동안 일정한 투여량(>80%의 표지된 투여량/kg)으로 ERT, 아갈시다제 알파 또는 아갈시다제 베타로 치료받은 환자에서 4주마다 2 mg/kg의 폐구니갈시다제 알파 치료의 안전성, 효능 및 약물동태를 등록하고 현재의 ERT에서 폐구시갈시다제 알파 2 mg/kg을 52주 동안 4주마다 정맥 내(IV)로 투여받을 수 있다(총 14회 주입).

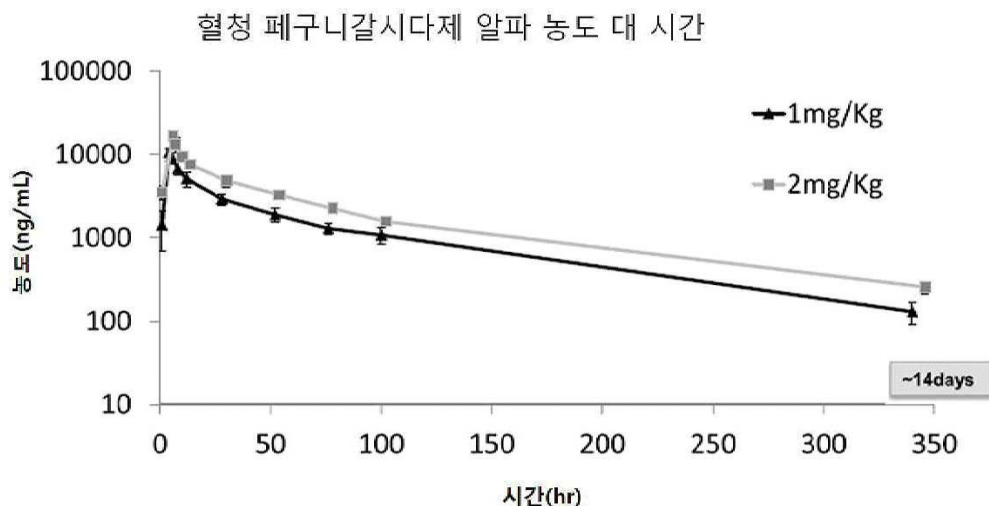
[0397] 주입에서 주입까지 4주 간격 동안 가교된 α -갈락토시다제 폐구니갈시다제 알파의 상승된 약물동태 성질 유지의 유의미한 증거는 α -갈락토시다제 폐구니갈시다제 알파가 다른 현재 승인되고, 상업적으로 이용가능한 파브리 ERT인 아갈시다제 베타(파브라자임TM, 젠자임, Cambridge MA) 및 아갈시다제 알파(레프리갈TM, 샤이어 휴먼 제네틱 테라피스(HGT), Cambridge, MA, USA)와 비교하여 상이하고 유리하다는 것을 확증하는 데 도움이 될 것이다

[0399] 본 발명이 이의 특정 구현예와 관련하여 설명되었지만, 많은 대안, 수정 및 변형이 당업자에게 자명하다는 것이 명백하다. 따라서, 첨부된 청구항의 사상 및 넓은 범위 내에 있는 그러한 모든 대안, 수정 및 변형을 포함한다.

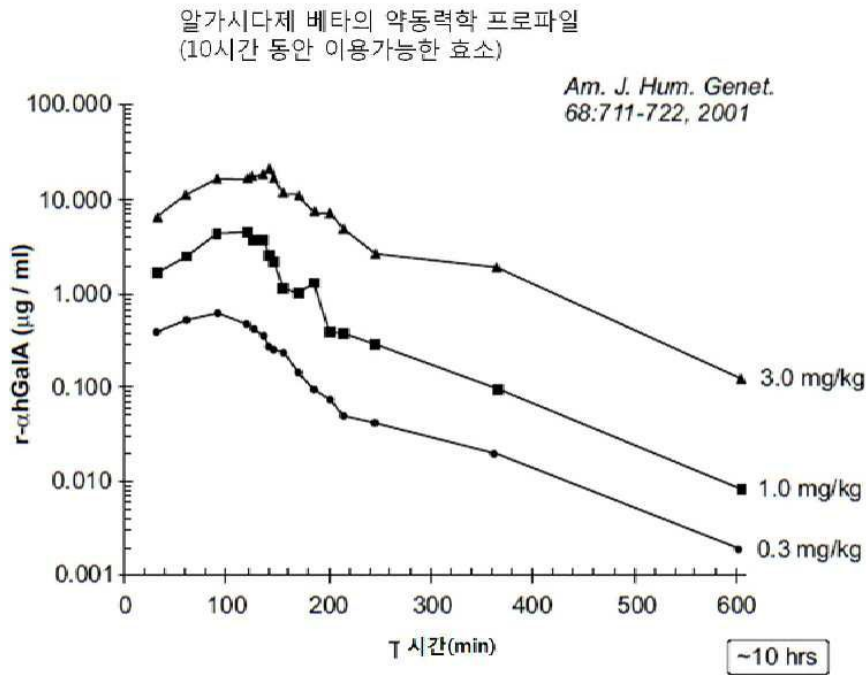
[0400] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 여기에 포함되는 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로서 전체적으로 통합된다. 또한, 본원에서 임의의 참조 문헌의 인용 또는 식별은 그러한 참조가 본 발명의 선행기술로서 이용가능하다는 인정으로 해석되어서는 안된다. 섹션 표제가 사용되는 한, 반드시 제한적인 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

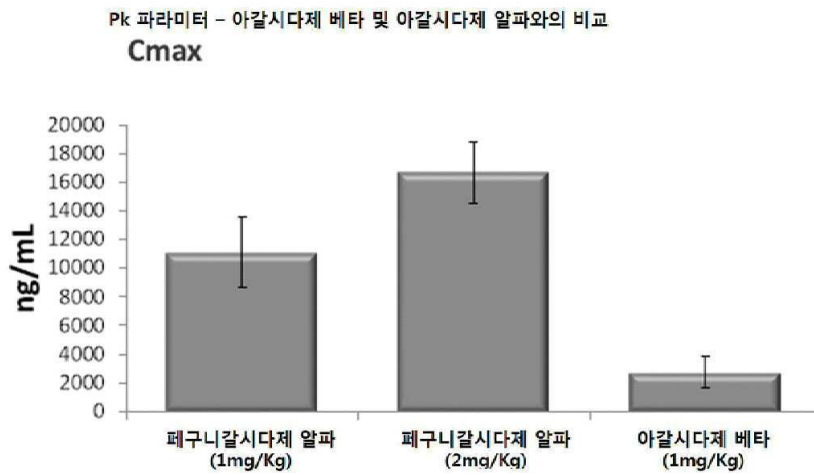
도면1



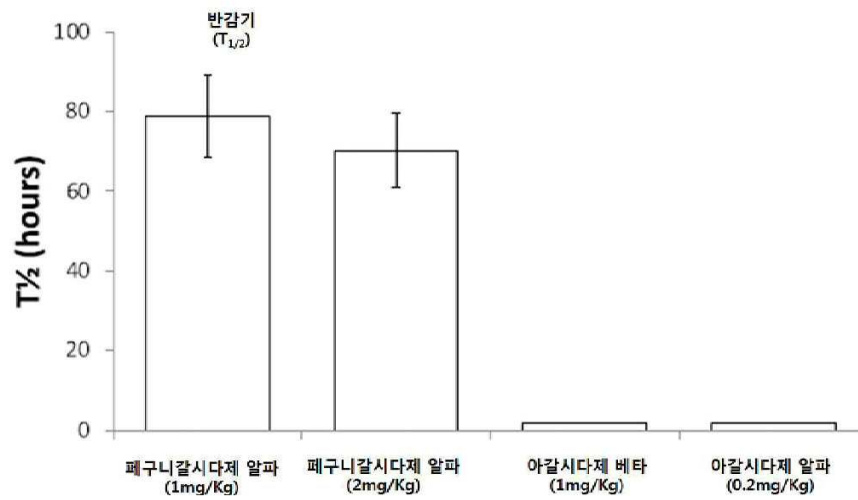
도면2



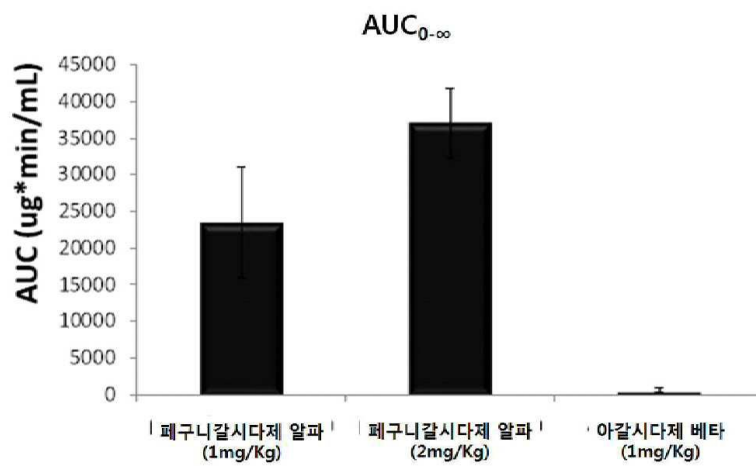
도면3a



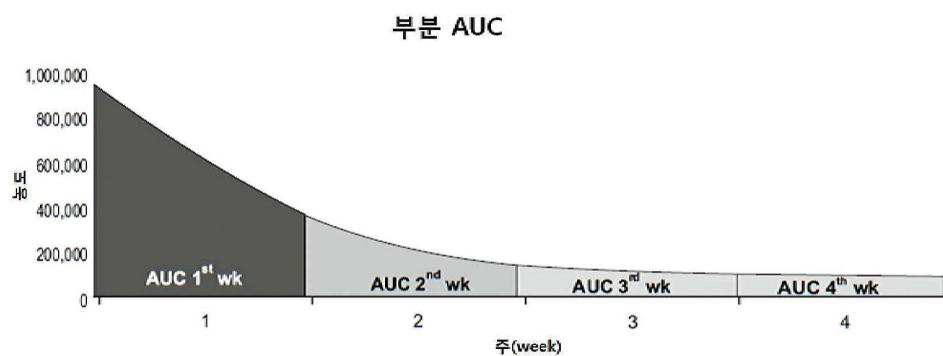
도면3b



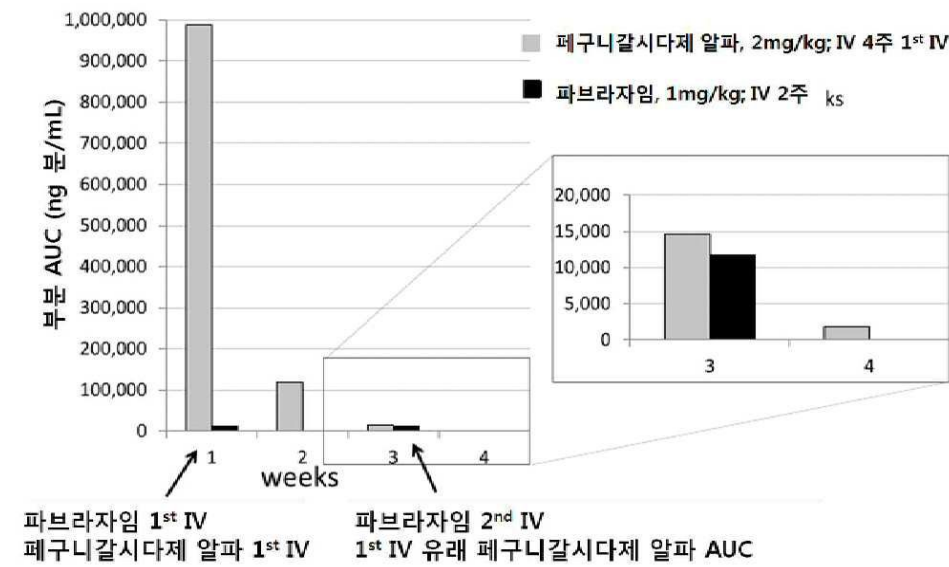
도면3c



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> Protalix Ltd.
- <120> THERAPEUTIC REGIMEN FOR THE TREATMENT OF FABRY USING STABILIZED
- <130> 72305_I24010C0038PIL
- <150> US 62/442,537
- <151> 2017-01-05
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 398
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp

1 5 10 15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys

20 25 30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu

35 40 45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp

50 55 60

Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln

65						70						75						80
Arg	Phe	Pro	His	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Asn	Tyr	Val	His	Ser	Lys			
					85						90						95	
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Val	Gly	Asn	Lys	Thr	Cys	Ala			
					100						105						110	
Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Phe	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe			
					115						120						125	
Ala	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	Cys	Tyr	Cys	Asp			
					130						135						140	
Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	His	Met	Ser	Leu	Ala	Leu			
					145						150						160	
Asn	Arg	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Val	Tyr	Ser	Cys	Glu	Trp	Pro	Leu	Tyr			
					165						170						175	
Met	Trp	Pro	Phe	Gln	Lys	Pro	Asn	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Cys			
					180						185						190	
Asn	His	Trp	Arg	Asn	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ser	Trp	Lys	Ser	Ile			
					195						200						205	
Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Trp	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Glu	Arg	Ile	Val	Asp			
					210						215						220	
Val	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Val	Ile	Gly			
					225						230						240	
Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Gln	Met	Ala	Leu	Trp			
					245						250						255	
Ala	Ile	Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Phe	Met	Ser	Asn	Asp	Leu	Arg	His	Ile			
					260						265						270	
Ser	Pro	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Ala	Ile			
					275						280						285	
Asn	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	Lys	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu	Arg	Gln	Gly	Asp			
					290						295						300	
Asn	Phe	Glu	Val	Trp	Glu	Arg	Pro	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Trp	Ala	Val			
					305						310						315	320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
325 330 335
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
340 345 350
Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
355 360 365
Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
370 375 380
Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu

385 390 395

<210> 2

<211> 405

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant A-Gal mature protein with N' terminal G and fused to

<400> 2

Gly Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His
1 5 10 15
Trp Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser
20 25 30
Cys Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser

35 40 45
Glu Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys
50 55 60
Trp Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro
65 70 75 80
Gln Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser
85 90 95
Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys
100 105 110

Ala Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr
115 120 125

Phe Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys
 130 135 140
 Asp Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Leu Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu
 165 170 175
 Tyr Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr
 180 185 190
 Cys Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser
 195 200 205
 Ile Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val
 210 215 220
 Asp Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile
 225 230 235 240
 Gly Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu
 245 250 255
 Trp Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His
 260 265 270
 Ile Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala
 275 280 285
 Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly
 290 295 300
 Asp Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala
 305 310 315 320
 Val Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr
 325 330 335
 Ile Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys
 340 345 350
 Phe Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu
 355 360 365
 Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu
 370 375 380

Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ser
385 390 395 400

Glu Lys Asp Glu Leu
405

<210> 3

<211> 404

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant A-Gal mature protein fused to SEKDEL without N'

<400> 3

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp

1 5 10 15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys

20 25 30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu

35 40 45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp

50 55 60

Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln

65 70 75 80

Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys

85 90 95

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala

100 105 110

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe

115 120 125

Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp

130 135 140

Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu

145 150 155 160

Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr

165 170 175

Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys

180 185 190

Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile

195 200 205

Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp

210 215 220

Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly

225 230 235 240

Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp

245 250 255

Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile

260 265 270

Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile

275 280 285

Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp

290 295 300

Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val

305 310 315 320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile

325 330 335

Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe

340 345 350

Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp

355 360 365

Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu

370 375 380

Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ser Glu

385 390 395 400

Lys Asp Glu Leu